

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. C. Weber

Prävention der atherosklerotischen Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung durch Tyrosinkinaseinhibitoren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Kristina Busygina

aus Tscheljabinsk, Russland

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg
Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Prof. Dr. med. Daniel Teupser

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Janina Jamasbi

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Eidesstattliche Versicherung

Busygina, Kristina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Prävention der atherosklerotischen Plaque-induzierten
Thrombozytenaktivierung durch Tyrosinkinaseinhibitoren**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 10.02.2020

Ort, Datum

Kristina Busygina

Unterschrift Doktorandin

Für meine Mama

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1 Thrombozytenfunktion	5
2.2 Mechanismen der Thrombozytenaktivierung	6
2.2.1 Adhäsion	6
2.2.2 Aktivierung, Formänderung und granuläre Sekretion	6
2.2.3 Aggregation	8
2.3 Entstehung atherosklerotischer Läsionen.....	9
2.4 Plaque-Ruptur, Plaque-Erosion und Atherothrombose	10
2.5 Antithrombozytäre Substanzen	12
2.5.1 Duale antithrombozytäre Therapie (<i>dual antiplatelet therapy</i> , DAPT)	12
2.5.2 GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten	14
2.5.3 Protease-aktivierter-Rezeptor-1-Antagonist Vorapaxar	15
2.6 Thrombozytäre Kollagenrezeptoren und Signaling über Tyrosinkinasen	16
2.6.1 GPVI und die sequentielle Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie, Syk und Btk	16
2.6.2 Integrin $\alpha_2\beta_1$	19
2.7 Tyrosinkinasehemmer	21
2.7.1 Src-Familien-Kinasen-Hemmer: PD173952	21
2.7.2 Syk-Hemmer: Syk Inhibitor II, R406	22
2.7.3 Btk-Hemmer: Ibrutinib (Imbruvica®), Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059	25
2.8 Mechanismen der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenadhäsion und Aggregation	27
2.9 Neue Strategien für antithrombozytäre Therapien	28
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	31
4. Materialien und Methoden	33
4.1 Materialien	33
4.1.1 Antikörper, Hemmsubstanzen und Chemikalien	33

4.1.2	Puffer und Lösungen	34
4.1.3	Stammlösungen	35
4.1.4	Verbrauchsmaterialien	36
4.1.5	Geräte und Software	36
4.2	Methoden	37
4.2.1	Blutentnahmen für <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Experimente	37
4.2.2	Thrombozytenzählung	38
4.2.3	Präparation, Konservierung und Aufbewahrung von humanem atherosklerotischen Plaquematerial	39
4.2.4	Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen	39
4.2.5	Bestimmung der ATP-Sekretion im Blut	40
4.2.6	Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen	40
4.2.6.1	<i>Beschichtung von Deckgläschen mit atherosklerotischem Plaquematerial</i>	41
4.2.6.2	<i>Beschichtung von Deckgläschen mit Kollagen</i>	41
4.2.6.3	<i>Durchführung der Flusseexperimente</i>	41
4.2.6.4	<i>Berechnung der Flussgeschwindigkeiten</i>	42
4.2.6.5	<i>Vorbereitung der Blutproben für die Flusseexperimente</i>	42
4.2.6.6	<i>Analyse und Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion und –aggregation an atherosklerotisches Plaquematerial, fibrilläres oder lösliches Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen</i>	43
4.2.7	Bestimmung der <i>in vitro</i> Verschlusszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-100®	43
4.2.8	Statistik	44
5.	Ergebnisse	45
5.1	Wirkung von PD173952 auf die Thrombozytenfunktion <i>in vitro</i>	45
5.1.1	PD173952 hemmt die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte Plättchenaggregation im Vollblut unter statischen Bedingungen	45
5.1.2	PD173952 hemmt die Plaque- und Kollagen-stimulierte ATP-Sekretion	47
5.1.3	PD173952 hemmt die Plättchenthrombenbildung induziert auf Plaquehomogenat, Plaqueschnitten und Kollagen unter arteriellem Blutfluss	48

5.2 Wirkung von Syk Inhibitoren (Syk Inhibitor II, R406) auf die Thrombozytenfunktion in vitro	52
5.2.1 Syk Inhibitor II hemmt die durch Plaque und Kollagen, aber nicht die durch TRAP und ADP stimulierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen	52
5.2.2 Syk Inhibitor II hemmt vollständig die durch Plaque und Kollagen, aber nicht die durch TRAP stimulierte thrombozytäre ATP-Sekretion	54
5.2.3 Geringe Konzentration von Syk inhibitor II hemmt selektiv die Plaque-, aber nicht die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flußbedingungen	55
5.2.4 R406 unterdrückt vorzugsweise die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation in Blut unter statischen Bedingungen	59
5.2.5 Wirkung von R406 auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	60
5.3 Wirkung von Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059) auf die Thrombozytenfunktion in vitro und ex vivo	61
5.3.1 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut unter statischen Bedingungen	62
5.3.2 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen in arteriell fließendem Blut die Plättchenthrombenbildung auf Plaque, jedoch nicht auf Kollagen	68
5.3.3 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen die Plaque-stimulierte ATP-Sekretion	74
5.3.4 Btk-Inhibition durch Ibrutinib beeinflusst nicht die thrombozytäre Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Funktion	74
5.3.5 Die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate erfordert die vWF-Bindung an GPIb	75
5.3.6 Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen und Flussbedingungen im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie	76
5.3.7 Wirkung von Ibrutinib ex vivo auf die Blutungszeit <i>in vitro</i>	80
5.3.8 Orale Einnahme von niedrigen Dosen Ibrutinib hemmt die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und arteriellem Fluss	80
6. Diskussion	86
6.1 Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss	86

6.2 Wirkungen von Inhibitoren der Src-Familien-Kinasen (PD173952) und Syk (Syk Inhibitor II, R406) auf die Thrombozytenaktivierung in vitro	87
6.3 Wirkungen von Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059) auf die Thrombozytenaktivierung in vitro und ex vivo	91
7. Klinische Relevanz	100
8. Zusammenfassung	101
9. Summary	103
10. Literaturverzeichnis	105
11. Appendix	i
11.1 Abbildungsverzeichnis	i
11.2 Videoverzeichnis	v
Danksagung	vii
Lebenslauf	x

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACP-196	Acalabrutinib
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin®
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AA	<i>arachidonic acid</i> , Arachidonsäure
AU, AU*min	willkürliche Aggregationseinheiten gemessen über den Zeitraum von 10 Minuten
Btk	Bruton's Tyrosinkinase
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CRP	<i>collagen-related peptide</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase-1
DG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DES	<i>drug-eluting</i> Stent
DAPT	<i>dual anti-platelet therapy</i> , duale antithrombozytäre Therapie
Fc	<i>fragment crystallizable</i> , Fc-Teil eines Antikörpers
FcR γ	Fc-Rezeptor- γ -Kette
GPO	Glycin-Prolin-Hydroprolin
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPVI	Glykoprotein VI
GPVI-Fc	rekombinantes dimeres Glykoprotein VI-Fc Fusionsprotein
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Grb-2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
HSA	humanes Serumalbumin
HIT	heparininduzierte Thrombozytopenie
IC ₅₀	<i>50 % inhibition concentration</i> ; 50 %-Hemmkonzentration
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
I-Domäne	<i>inserted domane</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> , Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITP	Immunthrombozytopenie
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i> , Lysophosphatidsäure
MCSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i> , Mantelzelllymphom
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
min	Minuten
MW	Mittelwert
MEA	<i>multiple electrode aggregometry</i> , Impedanzaggregometrie
NA	numerische Apertur
NSTEMI	<i>non-ST-segment elevation myocardial infarction</i> ; Nicht-ST-Hebungsmyokardinfarkt
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i> , Perkutane koronare Intervention
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PRP	<i>platelet rich plasma</i>

PFA-100®	<i>platelet function analyzer</i>
PAR-1, PAR-4	Protease-aktivierter-Rezeptor-1, Protease-aktivierter-Rezeptor-4
PKC	Proteinkinase C
s bzw. sek	Sekunden
Ser	Serin
SLP-76	<i>SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
SH2-Domäne	<i>Src homology 2 domain</i>
SH3-Domäne	<i>Src homology 3 domain</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i> ; ST-Hebungsmyokardinfarkt
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Thr	Threonin
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid
TP α	Thromboxane-Prostanoid Rezeptor α
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TF	<i>Tissue Factor</i>
TIA	Transitorische ischämische Attacke
Tec	T yrosine kinase e xpressed in h epatocellular c arcinoma
vWF	von Willebrand Faktor
XLA	X-chromosomale Agammaglobulinämie

2. Einleitung

2.1 Thrombozytenfunktion

Die Thrombozyten (Blutplättchen), sind mit einem Durchmesser von 2-4 μm die kleinsten Zellen des Blutes¹. Die Thrombozyten haben keinen Zellkern und sind dadurch nur eingeschränkt zur *De-novo*-Synthese von Proteinen fähig¹. Die normale Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt 150000 bis 300000 pro μl Blut. Thrombozyten werden als zytoplasmatische Abschnürungen von knochenmarkständigen Megakaryozyten in den Blutkreislauf freigesetzt, wo sie physiologischerweise etwa 8 bis 12 Tage zirkulieren, bevor sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber abgebaut werden¹.

Blutplättchen spielen eine zentrale Rolle bei der primären Hämostase. Unter physiologischen Bedingungen fließt das Blut in einem geschlossenen Kreislauf, ohne dass es zu Blutungen in die Umgebung oder zum Sistieren des Blutflusses kommt¹. Hierbei isoliert ein intaktes Endothel den Blutstrom von den thrombogenen Strukturen des Subendothels¹. Dabei befinden sich die Thrombozyten im inaktiven Zustand, weisen eine scheibenförmige Gestalt auf und zeigen keinerlei Interaktion miteinander¹. Kommt es zu einer Endothelläsion z.B. durch eine Gefäßwandverletzung, treten die Blutplättchen in Kontakt mit subendothelialen thrombogenen Gefäßwandbestandteilen und bilden zusammen mit den Komponenten der plasmatischen Gerinnungskaskade einen hämostatischen Thrombus, welcher die Läsion abdichtet und die Blutung zum Stillstand bringt (physiologische Hämostase)¹. Darüber hinaus sind die Thrombozyten entscheidend an der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen und der Atherothrombose beteiligt^{2,3}. Hierbei kommt es nach Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques zur Bildung eines intraluminalen plättchen- und fibrinreichen Thrombus, der die Arterie komplett oder teilweise verschließen und dadurch ein akutes ischämisches Ereignis auslösen kann³. Die Bildung eines Blutgerinnsels, sowohl im Rahmen der physiologischen Hämostase als auch bei der Atherothrombose, ist ein komplexer Vorgang, der neben der Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade eine Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwandläsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten erfordert³. Diese Mechanismen werden im Folgenden genauer erläutert.

2.2 Mechanismen der Thrombozytenaktivierung

2.2.1 Adhäsion

Nach Unterbrechung der Kontinuität des Endothels haben die Thrombozyten direkten Kontakt mit thrombogenen Matrixstrukturen, unter anderem verschiedenen Kollagentypen und von Willebrand Faktor (vWF)^{1, 3-5}. Die zirkulierenden Plättchen werden initial durch die Wechselwirkung von thrombozytärem Glykoprotein Ib (GPIb) mit subendotheliale vWF verlangsamt („*tethering*“). Subendotheliale vWF ist durch Sekretion aus Endothelzellen schon in der Matrix vorhanden. Zudem kann vWF in arteriell fließendem Blut nach Endothelläsion an subendotheliale Kollagenfasern binden^{3, 4, 6}. Voraussetzung dafür ist die scherinduzierte Konformationsänderung des globulären Plasma-vWF, welche dessen Bindung an subendotheliale Kollagenfasern ermöglicht⁵. Der an Kollagen gebundene vWF spielt eine wichtige Rolle für die Thrombusbildung im arteriellen System^{4, 5}. Die Interaktion von thrombozytärem GPIb mit vWF, welche insbesondere bei hohen Scherraten (>1000/s), wie in kleinen Arterien und Arteriolen, aber auch in atherosklerotisch stenosierte Gefäßen, für die Thrombozytenadhäsion bedeutsam ist, ist aufgrund einer hohen „*on/off-Rate*“ sehr schnell reversibel und führt zum transienten Anheften („*rolling*“) der Thrombozyten an die Endothelläsion. Dadurch wird der Kontakt der zwei thrombozytären Kollagenrezeptoren Glykoprotein VI (GPVI) und Integrin $\alpha_2\beta_1$ an die subendothelialen Kollagenfasern ermöglicht, was zu einer stabilen Thrombozytenadhäsion führt^{6, 7}. Anschließend kommt es zur Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung, bei der das GPVI die zentrale Rolle spielt^{6, 8}. Die genaue Struktur und Funktionsweise dieser beiden Kollagenrezeptoren wird im Abschnitt 2.6 ausführlich beschrieben.

Bei der Ausbildung einer festen Adhäsion spielt darüber hinaus das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ über seine Interaktion mit kollagengebundenem vWF und dem im Bereich einer Endothelschädigung freigelegtem Fibrinogen/Fibrin eine wichtige Rolle^{3, 6, 9}. Im Endstadium der Adhäsion kommt es zum Thrombozyten-*spreading* über die subendothelialen Matrixstrukturen, wodurch die Endothelläsion abgedichtet wird¹.

2.2.2 Aktivierung, Formveränderung und granuläre Sekretion

Bereits während des Adhäsionsvorgangs beginnt die Thrombozytenaktivierung. Dieser komplexe Prozess erfolgt in wenigen Sekunden und besteht aus mehreren Teilvorgängen, nämlich thrombozytärer Formveränderung („*shape change*“), Sekretion von Granulainhaltsstoffen, Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und Re-Organisation der Membranphospholipide, welche gemeinsam zur Bildung eines stabilen plättchenreichen Thrombus führen³.

Fibrilläres Kollagen, insbesondere Typ I und Typ III, ist von entscheidender Bedeutung nicht nur für die Adhäsion, sondern auch für die Aktivierung der Thrombozyten. Während das Integrin $\alpha_2\beta_1$ insbesondere für die Vermittlung einer stabilen Thrombozytenadhäsion an Kollagen verantwortlich ist, spielt das GPVI die zentrale Rolle bei der Kollagen-induzierten Aktivierung von Thrombozyten⁶. Die Interaktion von GPVI mit Kollagen initialisiert die Aktivierung von Integrinen $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$, die Gestaltveränderung adhärenter Thrombozyten, die granuläre Sekretion sekundärer Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP), die enzymatische Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden und deren Synthese zu Thromboxan A₂ (TxA₂) sowie die Re-Organisation der thrombozytären Plasmamembran mit Steigerung ihrer pro-koagulatorischen Aktivität¹⁰. Die GPVI-vermittelte Plättchenaktivierung wird durch das Integrin $\alpha_2\beta_1$ zusätzlich unterstützt¹¹.

Durch die Gestaltveränderung der Thrombozyten, welche durch Neuorganisation ihres Zytoskeletts geschieht, kommt es zur Bildung von Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien) und damit zur Vergrößerung der Zelloberfläche mit konsekutiver Verstärkung der thrombozytären Antwort. Ferner werden die sekretorischen Granula zentralisiert, was für den Sekretionsvorgang bedeutsam ist^{1, 3}.

Bei granulärer Sekretion setzen abhängig von der zytosolischen Ca²⁺-Schwellenkonzentration zunächst die dichten Granula und die α -Granula ihre Inhaltsstoffe frei, erst dann die Lysosomen^{1, 12, 13}. Die dichten Granula sezernieren v.a. ADP, ATP, Serotonin und Ca²⁺. Die α -Granula setzen Wachstumsfaktoren, Chemokine, Adhäsionsproteine, vWF, Thrombospondin sowie Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, Faktor V) frei¹. Schließlich sezernieren aktivierte Thrombozyten eine Reihe von Hydrolasen aus ihren Lysosomen, die für eine Auflockerung der subendothelialen Struktur sorgen und pathophysiologisch am Umbau der Gefäßwand bei atherosklerotischen Vorgängen beteiligt sind^{1, 13}. Die Sekretion der Granulainhaltsstoffe verstärkt den Aktivierungsprozess und leitet die sekundäre irreversible Phase der Aggregation durch Förderung der Fibrinbildung ein¹.

Die positiven „*feedback*“-Mediatoren ADP und TxA₂, sowie das durch die Aktivierung der Gerinnung gebildete Thrombin binden an spezifische Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine (G_i, G_q und G_{12/13}) gekoppelt sind. Sie potenzieren die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung und rekrutieren zirkulierende Thrombozyten, sodass ein rapides Thrombuswachstum ermöglicht wird^{3, 6, 14}. ADP aktiviert Thrombozyten über Bindung an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂. TxA₂ wirkt über die Thromboxan-Prostanoid-Rezeptoren TP α und TP β , wobei auf Thrombozyten nur TP α exprimiert ist¹⁵. Thrombin stimuliert die Thrombozytenaggregation über die Bindung an seine Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-4^{12, 16, 17}. Im Folgenden werden die jeweiligen Signalwege kurz erläutert.

G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie PAR-1, PAR-4 und P2Y₁₂, hemmen die Adenylatzyklase, wodurch die Bildung des inhibitorisch wirksamen cAMP stark verringert und damit die Wirkung des antiaggregatorisch wirksamen Prostazyklins (PCl₂) reduziert wird¹². Zudem setzen Gi-Proteine den βγ-Komplex frei, welcher unter anderem über die Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) sowie von Proteinkinase B die Thrombozytenaggregation stimuliert¹⁷.

G_q-gekoppelte Rezeptoren, wie P2Y₁, PAR-1, PAR-4 und der TPα, vermitteln die Aktivierung von Phospholipase C_β. Die Phospholipase C_β spaltet Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) der thrombozytären Plasmamembran unter Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃), das die Ca²⁺-Freisetzung aus dem dichten tubulären System stimuliert, und Diacylglycerol (DG), das die Proteinkinase C aktiviert, welche zahlreiche weitere Proteine phosphoryliert^{1, 3, 17}. Der Anstieg intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration stimuliert die Bildung von TxA₂ und führt zur Ca²⁺-Calmodulin-abhängigen Phosphorylierung der Myosinleichtketten und dadurch zur Formveränderung der Thrombozyten. Weiterhin vermittelt die Aktivierung der Phospholipase C_β die granuläre Sekretion sowie über die *inside-out*-Aktivierung des Fibrinogenrezeptors α_{IIb}β₃ die Thrombozytenaggregation^{12, 17}.

G_{12/13}-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie PAR-1, PAR-4 und TPα, vermitteln über die Aktivierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen der Rho-Familie die Re-Organisation des Zytoskeletts bei der Formveränderung der Thrombozyten^{12, 15, 17}. Dabei wird durch die Aktivierung von Rho und Rho-Kinase Ca²⁺-unabhängig die Phosphorylierung der Myosinleichtkette stimuliert, welche wie die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Phosphorylierung der Myosinleichtkette über den G_q-Signalweg die Interaktionen von Myosin mit Aktinfilamenten ermöglicht, die der thrombozytären Formveränderung zugrunde liegen^{12, 17, 18}.

Während der Thrombozytenaktivierung verändert sich die Organisation der thrombozytären Plasmamembran, sodass negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche exponiert werden, was die Anlagerung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren wie Faktor V, VIIIa, IXa und Xa und die Bildung eines katalytischen Prothrombinasekomplexes an der aktivierten Thrombozytenoberfläche ermöglicht. Das dadurch gebildete Thrombin ist ein starker Plättchenaktivator und führt über die Fibrinbildung zur Stabilisierung des hämostatischen Thrombus^{1, 3}.

2.2.3 Aggregation

Unter Aggregation versteht man den Kohäsionsvorgang zwischen mindestens zwei Thrombozyten¹. Thrombozytenaggregate können innerhalb weniger Minuten sehr groß werden (>1000 Thrombozyten) und einen hämostatischen oder okklusiven Thrombus bilden. Die essentielle Bedeutung hat dabei das

thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, auch Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) genannt¹. Durch Kollagen-, ADP-, TxA_2 - und Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung kommt es zur *inside-out*-Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie zur Steigerung der Oberflächendichte der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Moleküle durch deren Sekretion aus den α -Granula. Die Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt zur Steigerung der Affinität an seine Liganden, nämlich Fibrinogen, Fibrin, vWF und Fibronectin^{1, 3, 19, 20}. Der wichtigste Ligand des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist Fibrinogen. Fibrinogen kann die Thrombozyten untereinander vernetzen und dadurch Aggregate bilden⁹. Die Bindung von Fibrinogen an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist anfangs reversibel und wird nach Sekretion von Granulainhaltsstoffen irreversibel¹. Anschließend wird der Thrombus durch die Thrombin-vermittelte Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin und die $\alpha_{IIb}\beta_3$ - und Fibrin-vermittelte Gerinnselretraktion stabilisiert^{1, 21}.

2.3 Entstehung atherosklerotischer Läsionen

Akuter Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall führen seit Jahren die Todesursachenstatistiktabellen in Industrieländern an²². Die wichtigste pathophysiologische Grundlage dieser ischämischen Ereignisse stellt die Atherosklerose dar. Atherosklerose ist eine chronisch progrediente degenerative Erkrankung der Arterien, die durch Akkumulation von Lipiden und extrazellulären Matrixstrukturen sowie durch komplexe inflammatorische Vorgänge gekennzeichnet ist^{23, 24}. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Dyslipidämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, können eine Endotheldysfunktion induzieren^{14, 23, 25-27}. Diese entsteht bevorzugt an Gefäßverzweigungen oder in Gefäßkurvaturen, an denen es zur Verwirbelung des Blutstroms kommt²³. An solchen Stellen weist das Endothel eine erhöhte Durchlässigkeit für Lipoproteine, wie *low density lipoprotein* (LDL), auf, die subendothelial akkumulieren und dort eine Inflammation in Gang setzen^{24, 25, 28}. Es kommt zur gesteigerten Adhäsion und Transmigration von Monozyten, Mastzellen, Neutrophilen und T-Lymphozyten in die Intima^{14, 27, 29}. Vermittelt durch *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF) differenzieren die Monozyten zu Makrophagen^{25, 26}. Über spezifische *Scavenger*-Rezeptoren erkennen die Makrophagen das stark oxidierte LDL und nehmen dieses ins Zellinnere auf, wodurch sie zu sogenannten Schaumzellen werden, die für eine frühe, in der Regel asymptomatische atherosklerotische Läsion („*fatty streak*“) typisch sind^{25, 27, 30}. Schaumzellen und andere Entzündungszellen erzeugen ein hochinflammatorisches Milieu^{23, 26}. Es kommt zur Migration glatter Muskelzellen von der Media in die Intima, wo sie sich phänotypisch von kontraktile zu synthetisierenden Zellen umwandeln, und extrazelluläre Matrixproteine, vor allem Kollagene produzieren²⁵. An der Auslösung und Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens in der Intima sind auch die Thrombozyten beteiligt. Ihre Interaktion mit

Endothelzellen und Leukozyten amplifiziert die Inflammation in der Gefäßwand und ist von Bedeutung für die Progression der Atherosklerose^{2, 20, 31-34}.

Durch das Fortschreiten der Inflammation sowie durch die Apoptose von Schaumzellen und Akkumulation großer Mengen an extrazellulären Lipiden und Zelltrümmern entsteht aus einem *fatty streak* ein fibröser atherosklerotischer Plaque mit lipidreichem nekrotischen Kern und fibröser Kappe aus Kollagen- und Proteoglykan-reicher Matrix mit eingelagerten glatten Muskelzellen²⁴. Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen können Kalzifizierungen, Ulzerationen und Neovaskularisationen aufweisen^{14, 25, 35, 36}.

2.4 Plaque-Ruptur, Plaque-Erosion und Atherothrombose

Stabile atherosklerotische Läsionen zeichnen sich durch einen verhältnismäßig kleinen nekrotischen Kern bedeckt von einer gleichmäßig dichten fibrösen Kappe und geringe Entzündungsaktivität aus²⁶. Durch das Größenwachstum stabiler Plaques kann es zur Obstruktion einer Koronararterie kommen, was sich klinisch als stabile Angina pectoris äußert.

Die meisten fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques führen bedingt durch expansives *Remodelling* in der arteriellen Wand jedoch zu keiner signifikanten Gefäßstenose^{36, 37}. Daher sind fortgeschrittene vulnerable, rupturgefährdete Plaques oft asymptomatisch und in der Koronarangiographie nicht nachweisbar^{36, 38}. Deren Ruptur oder Erosion führt durch die Exposition des prothrombotischen Materials in den Blutstrom zur Atherothrombose, wodurch ein akutes ischämisches Ereignis hervorgerufen werden kann^{14, 27, 29}. Abhängig davon, ob der Gefäßverschluss in den Koronar- bzw. Zerebralarterien vorübergehend oder permanent ist, treten entweder instabile Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt bzw. eine transitorische ischämische Attacke (TIA) oder ein ischämischer Schlaganfall auf²⁷.

Akute Atherothrombosen entstehen vor allem durch Ruptur eines vulnerablen Plaques, seltener durch Plaque-Erosion³⁶. So werden 55-65 %, in manchen Veröffentlichungen sogar bis zu 75 % akuter koronarer Arterienverschlüsse, die zu einem Myokardinfarkt oder einem plötzlichen Herztod geführt haben, durch eine Plaque-Ruptur verursacht^{14, 27, 36}. Eine Studie untersuchte Karotisplaques von Patienten, die einen Schlaganfall oder eine TIA erlitten hatten, und von asymptomatischen Patienten, die sich einer Endarterektomie bei hochgradiger Karotisstenose unterzogen hatten. Hierbei zeigte sich, dass 90 % thrombosierter Karotisplaques, welche zu einem ischämischen Schlaganfall geführt hatten, durch eine Plaqueruptur zustande kamen³⁹.

Rupturgefährdete vulnerable Plaques zeichnen sich durch einen großen lipidreichen nekrotischen Kern und eine stark ausgedünnte fibröse Kappe aus, die eine hohe Dichte an Makrophagen und nur wenige glatte Muskelzellen aufweist^{27, 30, 36}. Die Produktion der extrazellulären Matrix nimmt ab³⁶. Zudem bauen die Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die vor allem durch Makrophagen freigesetzt werden, die Kollagenfasern der fibrösen Kappe ab und destabilisieren den Plaque dadurch zusätzlich²⁴.

Die Plaqueruptur erfolgt bevorzugt an der Plaqueschulterregion^{24, 40}. Hierbei werden verschiedene prothrombogene Substanzen aus dem Plaqueinneren dem Blutstrom ausgesetzt, wobei fibrilläres Kollagen Typ I und III sowie *Tissue Faktor* entscheidend für die Plaque-Thrombogenität sind^{8, 41, 42}. Im Vergleich zu Kollagenfasern einer gesunden Gefäßwand sind Kollagenstrukturen atherosklerotischer Plaques morphologisch sehr heterogen. Sie zeigen meist keine typische fibrilläre Struktur, sondern liegen gemischt in Form von kleineren und größeren, diffus verteilten und miteinander vernetzten Fragmenten vor^{8, 41}, welche vermutlich durch die proteolytische Spaltung der Kollagenstrukturen durch MMPs und lysosomale Enzyme entstehen^{3, 8, 23}. Dadurch wird deren Thrombogenität im Gegensatz zu der Intima gesunder Arterien deutlich erhöht. So zeigte sich, dass die Thrombozytenanheftung an menschliche atherosklerotisch veränderte Koronararterien deutlich höher im Vergleich zur normalen Arterienwand ist⁴¹, und dass in Mäusen die thrombozytäre Antwort in verletzten atherosklerotischen Karotisarterien viel ausgeprägter als nach Verletzung einer normalen Arterienwand ist⁴³. Ferner werden weitere adhäsive und thrombozytenaktivierende Plaquekomponenten, wie Phospholipide, Lysophosphatidsäure, vWF, Fibrin/Fibrinogen, Vitronektin, Laminin, Fibronektin, oxidiertes LDL, Cholesterinester und -kristalle, freigesetzt, welche bei der Thrombusbildung möglicherweise beteiligt sind^{8, 29, 41, 44, 45}.

Außer einer Plaque-Ruptur kann auch eine Plaque-Erosion zu einem akuten ischämischen Ereignis führen⁴⁶. Plaque-Erosion entsteht nach Endothelzerstörung wahrscheinlich durch dessen Apoptose oder Nekrose und wird in manchen Veröffentlichungen für bis zu 30-40 % akuter Koronarthrombosen verantwortlich gemacht^{14, 27, 47}. Betroffen sind meist Frauen und jüngere Männer⁴⁶. Zudem besteht eine Korrelation mit Nikotinabusus. Im Vergleich zu einer rupturgefährdeten atherosklerotischen Läsion ist ein erosionsanfälliger Plaque reich an Proteoglykanen und glatten Muskelzellen und enthält weniger Entzündungszellen²⁷. Inflammation und Lipidakkumulation scheinen bei der Pathogenese der Plaque-Erosion keine relevante Rolle zu spielen^{27, 46}. Bei der Plaque-Erosion entsteht meist ein wandständiger, nicht okklusiver Thrombus³⁰.

Nach einer Ruptur oder Erosion eines fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques kommt es zunächst, wie bei der physiologischen Hämostase, zur transienten Adhäsion der Blutplättchen an das Subendothel,

vermittelt durch die Interaktion des thrombozytären GPIb mit kollagengebundenem vWF^{3, 14, 48}. Anschließend erfolgt die Plaque-induzierte Thrombusbildung in 2 aufeinanderfolgenden Schritten: nach der ersten, schnell ablaufenden Phase der GPVI-abhängigen Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf Plaque-Kollagen kommt die zweite Phase, in der durch den Plaque-*tissue-factor* Thrombin und Fibrin gebildet werden⁴². Hierbei wurde gezeigt, dass die Plaque-induzierte Thrombenbildung durch die Inhibition von GPVI, jedoch nicht von Plaque-*tissue-factor* gehemmt werden kann⁴².

Während die Thrombusbildung an normales Bindegewebskollagen Typ I und Typ III unter Fluss die koordinierte Aktivierung der beiden thrombozytären Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ erfordert^{11, 49}, stimulieren die heterogenen Plaque-Kollagenstrukturen die Thrombusbildung ausschließlich über die Aktivierung des thrombozytären GPVI^{8, 50}. So konnte die Plaque-induzierte Thrombusbildung durch GPVI-Antikörper aber nicht durch Antikörper gegen das Integrin $\alpha_2\beta_1$ blockiert werden^{8, 50}. Dies ließ sich auch in Mausmodellen bestätigen, in denen die durch Plaqueverletzung induzierte Thrombose durch Anti-GPVI-Antikörper gehemmt wurde^{43, 51}. Zudem konnten Mausplättchen mit fehlender GPVI-Expression keine Thromben auf den atherosklerotischen Plaques bilden⁸.

2.5 Antithrombozytäre Substanzen

Thrombozyten spielen die zentrale Rolle bei der Atherothrombose, welche die pathogenetische Grundlage für Myokardinfarkt und ischämischen Schlaganfall darstellt³. Daher steht die antithrombozytäre Therapie im Mittelpunkt der Prävention atherothrombotischer Ereignisse^{10, 52}. Im Folgenden werden verschiedene derzeit verwendete antithrombozytäre Substanzen vorgestellt, und im Abschnitt 2.9 wird auf neue in klinischen Studien getestete Plättchen-Hemmer eingegangen.

2.5.1 Duale antithrombozytäre Therapie (*dual antiplatelet therapy, DAPT*)

Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®) ist der am meisten verbreitete Thrombozytenaggregationshemmer. In niedriger Dosis blockiert ASS selektiv und irreversibel die Cyclooxygenase-1 (COX-1), indem sie deren Serin-Rest in der Position Ser529 acetyliert. Hierdurch wird die Bildung von Thromboxan A₂ für die gesamte Lebensdauer der Thrombozyten gehemmt, sodass die TxA₂-vermittelte Verstärkung der Plättchenaggregation ausbleibt^{53, 54}. Niedrig-dosierte ASS-Therapie wird zur Primär- und Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Ereignisse sowie nach arteriellen gefäßchirurgischen oder interventionellen Eingriffen eingesetzt^{52, 53}. Der klinische Nutzen, der durch den Einsatz von ASS in der Primärprävention erzielt wird, ist nach Abwägung der Risikoreduktion für kardiovaskuläre Ereignisse

gegenüber Steigerung des Blutungsrisikos umstritten⁵⁵. Die Meta-Analysen aus dem Jahr 2016, in denen der Nutzen von ASS in der Primärprävention untersucht wurde, ergaben eine 22 %-ige Reduktion der Inzidenz für Myokardinfarkt, aber keine Risikoreduktion für kardiovaskulären Tod oder Schlaganfall bei gleichzeitig einem um 58% höheren Risiko für gastrointestinale Blutungen und einem um 27 % höheren Risiko für Hirnblutungen⁵⁵⁻⁵⁷. Zwei große, in Jahr 2018 publizierte randomisierte Studien, die den Einsatz von ASS in der Primärprävention untersuchten, ergaben keine Risikoreduktion für kardiovaskuläre Ereignisse und Schlaganfall und zeigten eine signifikant erhöhte Blutungsrate^{58, 59}. In der Sekundärprävention überwiegen zwar die Vorteile der ASS-Einnahme bei der Risikoreduktion für erneute kardiovaskuläre Ereignisse die Blutungsrisiken⁵⁵, wobei das Risiko für erneute atherothrombotische Ereignisse durch ASS nur um ca. 25 % reduziert wird^{53, 54}. Somit kann die Mehrheit akuter ischämischer Ereignisse durch ASS nicht verhindert werden^{53, 54}. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen durch ASS nicht gehemmt wird⁴⁸.

Neben ASS werden P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten in der Prävention atherothrombotischer Ereignisse, insbesondere bei akutem Koronarsyndrom und perkutaner koronarer Intervention (PCI), das heißt einem Verfahren zum Aufdehnen stenosierter oder verschlossener Herzkranzgefäße, meist für 6-12 Monate eingesetzt⁵². Durch die Bindung an den P2Y₁₂-Rezeptor verhindern sie die ADP-abhängige Verstärkung der Plättchenaktivierung. Die oralen irreversiblen P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel sind Prodrugs und müssen zunächst in der Leber zu ihren aktiven Metaboliten umgewandelt werden^{52, 60}. Ticagrelor und Cangrelor sind in Gegensatz dazu direkte und reversible Hemmer, wobei Ticagrelor oral und Cangrelor intravenös verabreicht werden^{52, 60}.

Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte haben eine über Jahre erhöhte Prädisposition für erneute Plaqueruptur und somit ein deutlich erhöhtes Risiko, einen erneuten Myokardinfarkt zu erleiden⁶¹. Für die Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse nach Myokardinfarkt bzw. bei und nach einer PCI bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom etablierte sich die duale antithrombozytäre Therapie (*dual anti-platelet therapy*, DAPT) mit niedrigdosierter ASS und einem P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten (Clopidogrel, Ticagrelor oder Prasugrel). Trotz nachgewiesener Vorteile einer DAPT für die Patienten mit Myokardinfarkt zeichnet sich deren Einsatz durch eine auf 22 % begrenzte relative Risikoreduktion für erneute atherothrombotische Ereignisse und ein signifikant erhöhtes Blutungsrisiko im Vergleich zur alleinigen ASS-Therapie aus⁶¹. In einer großen randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten klinischen Studie wurde der Nutzen einer DAPT mit ASS und Ticagrelor in zwei Dosierungen mit der alleinigen ASS-Einnahme bei Patienten nach Myokardinfarkt verglichen⁶². Hierbei zeigte sich zwar eine signifikante Risikoreduktion für kardiovaskulären Tod, Myokardinfarkt oder ischämischen Schlaganfall. Der

nachgewiesene Nutzen der DAPT ging jedoch mit erhöhtem Blutungsrisiko einher⁶². Ähnliches zeigte sich in einer anderen großen randomisierten klinischen Studie, in welcher eine über 12 Monate nach einer PCI mit Implantation eines *Drug-Eluting-Stents* (DES) hinaus fortgeführte DAPT mit Clopidogrel oder Prasugrel gegenüber alleiniger ASS-Einnahme verglichen wurde⁶³. Fortgesetzte DAPT reduzierte zwar das Risiko für eine Stent-Thrombose und für erneute kardiovaskuläre Ereignisse, führte jedoch ebenfalls zur deutlich erhöhten Blutungsrate⁶³. Eine bessere Pharmakokinetik der neueren P2Y₁₂-Antagonisten (Ticagrelor, Prasugrel) geht mit effektiverer plättchenhemmender Wirkung, gleichzeitig jedoch mit Erhöhung des Blutungsrisikos einher^{60, 64, 65}.

Nach ischämischem Schlaganfall oder transitorischer ischämischer Attacke (TIA) ist das Risiko für nachfolgende ischämische Ereignisse innerhalb der ersten 90 Tage besonders hoch⁶⁶⁻⁶⁸. Die Vorteile einer ASS-Einnahme im Rahmen der Sekundärprävention zerebrovaskulärer Ereignisse sind insbesondere in den ersten 90 Tagen limitiert^{66, 69}. Eine große randomisierte, doppel-blinde Studie untersuchte 13199 Patienten, welche nach einem ischämischen Schlaganfall oder einer TIA entweder Ticagrelor oder ASS für 90 Tage sekundärprophylaktisch erhielten. Hierbei ergab sich kein Vorteil für Ticagrelor im Vergleich zu ASS in Bezug auf Risikoreduktion für erneuten ischämischen Schlaganfall, Myokardinfarkt oder Tod⁶⁶.

2.5.2 GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten

GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten hemmen die Fibrinogen-vermittelte Plättchenaggregation und Thrombusbildung, indem sie an den GPIIb/IIIa-Rezeptor binden und seine Interaktion mit Fibrinogen verhindern³². Die derzeit verfügbaren 3 Präparate dieser Substanzklasse – Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban – können nur parenteral appliziert werden und zeichnen sich durch einen sehr schnellen Wirkeintritt und eine hochpotente antithrombozytäre Wirkung aus⁵². GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten werden zur Behandlung eines schweren akuten Koronarsyndroms sowie zur Prävention eines ischämischen Ereignisses periinterventionell bei einer PCI eingesetzt⁵². Aufgrund eines ungünstigen Nebenwirkungsprofils mit einem nicht unerheblich gesteigerten Blutungsrisiko beschränkt sich der Einsatz von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten auf die Hochrisikopatienten, bei denen die thrombotischen Komplikationen ein erhöhtes Blutungsrisiko deutlich überwiegen^{52, 70}. Eine große Meta-Analyse, welche insgesamt 10085 Patienten, die nach einem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) einer PCI unterzogen wurden, untersucht hatte, ergab keine Reduktion der 30-Tage-Mortalität und der Re-Infarkt-Rate durch die GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten⁷⁰. Hierbei zeigte sich jedoch eine Korrelation zwischen dem Risikoprofil der Patienten und der Auswirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten auf die Mortalität, das heißt je ungünstiger das Risikoprofil, desto deutlicher war der Vorteil von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten in

Bezug auf Reduktion der Mortalität, nicht aber der Re-Infarkt-Rate⁷⁰. Die Anwendung von GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten nach akutem ischämischem Schlaganfall wird aufgrund fehlender Vorteile in Bezug auf Reduktion der Mortalität und Behinderung nach einem Schlaganfall und einer deutlich erhöhten Rate an symptomatischen oder sogar fatalen intrakraniellen Blutungen nicht empfohlen^{71, 72}. Insgesamt spielen die GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten im klinischen Alltag eher eine untergeordnete Rolle⁵².

2.5.3 Protease-aktivierter-Rezeptor-1-Antagonist Vorapaxar

Ein neuer Thrombozytenaggregationshemmer Vorapaxar hemmt durch die Bindung an den Thrombinrezeptor Protease-aktivierter-Rezeptor-1 (PAR-1) die Thrombin-induzierte Sekretion und Plättchenaggregation. Vorapaxar wird zur Sekundärprophylaxe nach einem Myokardinfarkt sowie bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) eingesetzt³². Eine große randomisierte Studie mit 12944 Teilnehmern ergab keine Reduktion des primären Endpunktes, welcher sich aus kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall, erneutem ischämischem Ereignis mit Hospitalisierung und Koronarintervention zusammensetzte. Aufgrund einer deutlich erhöhten Blutungsrate, inkl. intrakranieller Blutungen, musste die Studie vorzeitig beendet werden⁷³. Eine andere Studie zeigte zwar eine Risikoreduktion für kardiovaskulären Tod und ischämische Ereignisse durch Vorapaxar bei Patienten mit Myokardinfarkt, ergab jedoch ebenfalls ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko⁷⁴.

Die derzeit verwendeten antithrombozytären Substanzen senken zwar das Risiko für akute ischämische Ereignisse, tun dies jedoch nur im begrenzten Umfang sowie auf Kosten eines erhöhten Blutungsrisikos^{61-66, 69, 73, 74}. Das erschwert die Balance-Findung zwischen ischämischen und Blutungsrisiken einer dauerhaften antithrombozytären Therapie^{75, 76}. Daher wären neue therapeutische Ansätze wünschenswert, welche die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung effizient und selektiv, ohne Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase hemmen würden.

2.6 Thrombozytäre Kollagenrezeptoren und *Signaling* über Tyrosinkinasen

Endothelläsion bei einer Gefäßverletzung führt zur rapiden Thrombozytenaktivierung durch subendotheliale Kollagenfasern. Die Interaktion der Thrombozyten mit Kollagenfasern geschieht hauptsächlich über 2 membranständige Kollagenrezeptoren, nämlich GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ ^{6, 7}. Das GPVI hat hierbei die zentrale Bedeutung für die Adhäsion, Aktivierung, Aggregation und Regulation der prokoagulatorischen Aktivität der Thrombozyten^{6, 11}. Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt eine stabile Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern und unterstützt die GPVI-induzierte Plättchenaktivierung^{11, 49}.

2.6.1 GPVI und die sequentielle Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie, Syk und Btk

GPVI gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie der Oberflächenrezeptoren und stellt ein 60- bis 65-kDa-großes Membranglykoprotein dar, welches ausschließlich in Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert ist^{6, 77}. GPVI ist mit einem Fc-Rezeptor- γ -Ketten-Dimer (FcR γ) nicht-kovalent assoziiert, welches mit seiner ITAM-Region („Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv“) als signalweiterleitender Teil des GPVI-FcR γ -Komplexes fungiert und über Tyrosinkinasen und PLC γ 2 die Thrombozyten aktiviert^{21, 77}.

GPVI bindet an fibrilläres nicht lösliches Kollagen⁷⁸. Hierbei werden hauptsächlich aneinander gereihte GPO-(Glycin-Prolin-Hydroprolin)-Sequenzen des Kollagens von GPVI erkannt und gebunden^{79, 80}. Es wurde beschrieben, dass GPVI auch an weitere Komponenten der extrazellulären Matrix – Laminin, Fibronectin, Adiponektin, sowie an Fibrin bindet^{77, 81}. Zu den nicht-physiologischen Liganden des GPVI gehören das künstlich hergestellte „*collagen related peptide*“ (CRP), welches aus aneinander gereihten GPO-Sequenzen besteht und die Kollagen-Tripelhelix nachahmt, sowie das Schlagentoxin Convulxin, welches den potentesten GPVI-Agonisten darstellt⁷.

Der GPVI-FcR γ -Komplex wird in 4000 bis 6000 Kopien pro Plättchen als GPVI-Monomer und Dimer auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert^{80, 82}. Ein GPVI-Dimer wird durch zwei Rücken an Rücken angeordnete GPVI-FcR γ -Komplexe gebildet (Abb. 1)^{77, 80, 82-84}. Nur der dimere GPVI-FcR γ -Komplex weist mit seiner einzigartigen Konformation eine hohe Affinität für fibrilläres Kollagen auf^{77, 80, 85}. Circa ein Drittel aller GPVI-Moleküle liegt in ruhenden Plättchen in dimerer Form vor⁸⁰. Diese präformierten GPVI-Dimere können rasch mit hoher Affinität an Kollagen binden und sind essenziell für eine schnelle Plättchenadhäsion und Aktivierung⁸⁰. Durch Bindung an Kollagen oder bei Thrombozytenaktivierung durch weitere Agonisten, wie Thrombin, kommt es zur signifikanten Steigerung der Anzahl von GPVI-Dimeren, wobei die Zahl der GPVI-

Moleküle pro Zelle konstant bleibt^{6, 80, 86}. Die GPVI-Monomere dienen als Pool für die Bildung von GPVI-Dimeren nach Plättchenaktivierung⁸⁰.

Humanes GPVI setzt sich aus 339 Aminosäuren zusammen. Der schematische Aufbau von GPVI ist in der Abbildung 1 dargestellt. Seine extrazelluläre Region beinhaltet die Kollagen-Bindungsstelle, welche von 2 über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Immunglobulin-C2-ähnlichen Domänen gebildet wird^{7, 83}. Ein Ser/Thr-reicher Muzin-ähnlicher Schaft verbindet die extrazelluläre Domäne mit der Transmembranregion⁷⁸. Über eine Salzbrücke zwischen dem Arginin-Rest in der 3. Position der Transmembrandomäne sowie den ersten 6 juxtamembranen Aminosäuren des GPVI-Rezeptors einerseits und einem Aspartat-Rest des FcRγ-Ketten-Dimers andererseits wird ein GPVI-FcRγ-Komplex gebildet^{6, 77}. Ein kurzer, aus 51 Aminosäuren bestehender zytoplasmatischer Fortsatz enthält eine prolinreiche Sequenz (PxxP), welche die Src-Familien-Kinase Lyn über ihre SH3-Domäne („*Src homology 3 domain*“) konstitutiv bindet^{77, 87}. Dadurch wird der GPVI-Rezeptor in einen sogenannten *ready-to-go*-Zustand versetzt, so dass eine schnelle Aktivierung nach Kollagen-Exposition ermöglicht wird^{6, 21, 77}. Im Gegensatz zu Lyn bindet Fyn nicht konstitutiv an die prolinreiche Region des GPVI, sondern erst nach Ligandenbindung an GPVI und ist für die dauerhafte Signalübertragung zuständig^{77, 87}. Der zytoplasmatische Teil enthält außerdem eine an basischen Aminosäuren reiche Sequenz, die an Calmodulin bindet. Die Rolle dieser Interaktion bei der GPVI-abhängigen Aktivierung ist derzeit nicht vollständig geklärt⁷⁸.

FcRγ-Ketten-Dimer besteht aus zwei identischen, über Disulfid-Brücken miteinander verknüpften FcRγ-Ketten (Abb. 1)^{6, 77}. Jede FcRγ-Kette weist eine sogenannte ITAM-Region auf, welche 2 YxxL-Sequenzen enthält, die durch 7 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Ligand-induzierte Quervernetzung des GPVI-Rezeptors initialisiert die Phosphorylierung des ITAM-Motivs durch die Src-Familien-Kinasen Fyn und Lyn^{6, 10, 21, 77, 81}. Anschließend bindet die Syk mit ihren Tandem-SH2-Domänen („*Src homology 2 domain*“) an die phosphorylierten Tyrosin-Reste der ITAM-Region und unterzieht sich dabei einer Auto- sowie einer Lyn/Fyn-vermittelten Phosphorylierung^{21, 78}. Syk wird dadurch aktiviert und induziert daraufhin zusammen mit Lyn und Fyn über die Proteinphosphorylierung die Bildung eines Signalosoms aus Adapter- und Effektor-Proteinen (Abb. 1)^{21, 77}. Hierbei bilden die Adapter-Proteine ein intrazelluläres Gerüst, das die Effektor-Proteine mit ihrem Substrat in Kontakt bringt. Im Zentrum dieses Signalosoms befinden sich das Transmembranadapterprotein LAT und 2 zytosolische Adapter-Moleküle SLP-76 und Gads. Diese Proteine binden an verschiedene Signalmoleküle, die gemeinsam die Aktivität des wichtigsten Effektor-Moleküls der GPVI-Signalkaskade – PLCγ2 – regulieren. Syk und SLP-76 sind von essenzieller Bedeutung für die Aktivierung der PLCγ2⁷⁷, während die Tyrosinkinase der Tec-Familie (Btk- und Tec-Kinase) und die GTP-Austausch-Proteine der Vav-Familie (Vav1/3) die Phosphorylierung und Aktivierung der PLCγ2

in Lymphozyten ähneln. Hier führt die PI3K-Aktivierung zu einer Akkumulation des Phospholipids PIP3 in der Zellmembran, an welches die PH-Domäne von Btk bindet, mit dem Ergebnis, dass Btk vom Zytosol an die Zellmembran transloziert. Anschließend phosphoryliert die membrangebundene Src-Kinase Lyn Btk an Y551, einer hochkonservierten Stelle in der katalytischen Domäne zytoplasmatischer Proteintyrosinkinasen. Daraufhin erfolgt die Btk-Autophosphorylierung an Y223 in der SH3-Domäne, welche für die Stimulation der Kinase-Aktivität essentiell ist. Funktionell aktives membrangebundenes Btk ist dann bereit, stromabwärts die PLC γ 2 zu phosphorylieren⁹⁰. Die Beobachtungen in Thrombozyten, dass die Btk-Aktivierung nach GPVI- und GPIb-Stimulation durch PI3-Kinase-Inhibitoren gehemmt werden kann^{88, 89}, unterstreicht die Rolle der PI3-Kinase bei der Btk-Aktivierung, auch in Thrombozyten.

2.6.2 Integrin $\alpha_2\beta_1$

Integrin $\alpha_2\beta_1$, welches 1985 als erster Kollagenrezeptor entdeckt wurde,⁹¹ wird in 2000-4000 Kopien pro Plättchen exprimiert⁹². Integrin $\alpha_2\beta_1$ stellt ein nichtkovalent verbundenes Heterodimer dar. Die α - sowie die β -Untereinheit bestehen jeweils aus einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, einem kleinen transmembranären und einem carboxyterminalen zytoplasmatischen Teil^{1, 6}. Die α -Kette enthält 7 N-terminale Tandemwiederholungen, welche sich zu einer 7-Blatt- β -Propellerstruktur falten. Innerhalb der α -Untereinheit befindet sich eine aus ca. 200 Aminosäuren bestehende eingesetzte I- (*inserted*) Domäne, welche über ihre Kationenbindestelle, auch MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) genannt, mit Kollagen interagiert. Diese zeigt eine klare Präferenz für die zweiwertigen Metallionen Mg²⁺ und Mn²⁺^{7, 92}. Möglicherweise existieren noch weitere Kollagen-bindende Motive⁹³. Die β -Untereinheit verfügt über zahlreiche Disulfidbrücken und enthält eine sog. endogene Disulphid-Isomerase-Aktivität, welche die Konformationsänderungen von Integrin und somit die Affinität der α_2 -I-Domäne für Kollagen reguliert⁷.

Integrin $\alpha_2\beta_1$ spielt eine wichtige Rolle bei der Kollagen-induzierten Adhäsion und beim *spreading* der Thrombozyten sowie bei der Thrombusstabilisierung unter Flußbedingungen^{6, 11, 49}. Die Interaktion von Integrin $\alpha_2\beta_1$ mit Kollagen hängt größtenteils von der GPVI-vermittelten Plättchenaktivierung ab^{78, 94}. Ähnlich wie Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ liegen $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptoren meist in ruhendem Zustand auf der Oberfläche zirkulierender Plättchen vor und sind auf eine *inside-out*-Aktivierung durch intrazelluläre Signale angewiesen, damit eine effiziente Bindung an Kollagen ermöglicht wird^{6, 9}. Dies konnte 1998 durch Untersuchung der Interaktion von Integrin $\alpha_2\beta_1$ mit löslichem Kollagen gezeigt werden. Ruhende Plättchen waren nicht in der Lage, an lösliches Kollagen zu binden. Erst nach Thrombozytenaktivierung durch den Antikörper TS2/16 oder Plättchen-Agonisten ADP, Thrombin oder CRP kam es zu einer hochaffinen $\alpha_2\beta_1$ -vermittelten Adhäsion der Thrombozyten an lösliches Kollagen⁹⁴.

Im Gegensatz zum GPVI-Rezeptor ist Integrin $\alpha_2\beta_1$ in der Lage, sowohl an fibrilläres als auch an lösliches Kollagen zu binden^{94, 95}. Mittels künstlicher kollagenverwandter Hexapeptide wurde das GFOGER-Motiv als wichtigste hochaffine $\alpha_2\beta_1$ -erkennende Sequenz in verschiedenen Kollagentypen (Typ I, II, IV) identifiziert, welche für die $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Adhäsion und *spreading* verantwortlich ist^{93, 96-98}. Es existieren auch weitere $\alpha_2\beta_1$ -erkennende Sequenzen, wie GLOGER, GLSGER, GMOGER, GAOGER, GQRGER, mit welchen $\alpha_2\beta_1$ erst nach seiner Aktivierung interagieren kann⁹³. In einem begrenzten Umfang kann eine stabile Plättchenadhäsion an fibrilläres Kollagen direkt über $\alpha_2\beta_1$ erfolgen^{21, 49}. So zeigten Auger et al., dass Mausplättchen mit fehlender GPVI-Expression oder blockierter Src-Kinasen-Aktivität über das Integrin $\alpha_2\beta_1$ an fibrilläres Kollagen adhärten⁴⁹. Dieser Prozess wird möglicherweise über die $\alpha_2\beta_1$ -spezifische GFOGER-Sequenz des Kollagens vermittelt^{21, 93}.

Obwohl die Rolle des Integrins $\alpha_2\beta_1$ bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenadhäsion und Unterstützung der Plättchenaktivierung gut beschrieben ist, ist nur wenig über die genauen *outside-in*-signaling-Mechanismen dieses Rezeptors bekannt^{6, 7, 11, 49, 98, 99}. Wie GPVI stimuliert das Integrin $\alpha_2\beta_1$ auch die Aktivierung der PLC γ 2 mit konsekutiver Freisetzung von Ca^{2+} und PKC-Stimulation. Der nachgeschaltete Integrin $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Ca^{2+} -abhängige Pyk2/PI3K β /Akt-Signalweg spielt eine Rolle bei der *inside-out*-Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins und trägt somit zur Thrombusbildung unter Fluss bei. Dieser Signalweg scheint allerdings keine Bedeutung für die Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Plättchenadhäsion zu haben⁹⁹.

GPVI ist der zentrale Rezeptor bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung⁶. Bei Thrombozyteninteraktion mit fibrillärem Kollagen spielen GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ komplementäre Rollen^{11, 49}. Auger etc. zeigten in einer Reihe von Experimenten, in denen menschliche und murine Thrombozyten unter den gleichen Untersuchungsbedingungen, bei Verwendung identischer oder äquivalenter experimenteller Ansätze, untersucht wurden, dass 2 verschiedene Mechanismen einer stabilen Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten auf Kollagenfasern existieren: der eine beruht auf Aktivierung von GPVI und Src-Familien-Kinasen und der andere basiert auf Aktivierung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ ⁴⁹. In einem gewissen Umfang ist das Integrin $\alpha_2\beta_1$ in der Lage, die Thrombozytenadhäsion unabhängig vom GPVI-/Src-Signalweg zu induzieren⁴⁹. Die Integrin $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Adhäsion stärkt die Interaktion von GPVI mit Kollagen, was zur Verbesserung der Signaltransduktion, weiteren Stimulation der Integrinaktivität und Thrombozytenaktivierung mit Entwicklung der pro-koagulatorischen Aktivität führt^{6, 11, 77}.

2.7 Tyrosinkinasehemmer

Wie im Kapitel 2.6.1 erläutert, ist GPVI von essentieller Bedeutung für die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung. Nach Kollagenbindung an dimeres GPVI werden Src-Familien-Kinasen sowie Syk

und Btk aktiviert^{21, 77}. In dieser Dissertation wurden die thrombozytären Wirkungen von Inhibitoren dieser verschiedenen Tyrosinkinasen untersucht.

2.7.1 Src-Familien-Kinasen-Hemmer: PD173952

Src-Familie schließt insgesamt 8 Tyrosinkinasen, nämlich Lyn, Fyn, Src, Fgr, Blk, Hck, Yes und Lck, ein^{21, 100, 101}. Src-Familien-Kinasen sind in verschiedenen Zellen exprimiert und in viele zelluläre Vorgänge, wie Proliferation, Zelldifferenzierung und Adhäsion, involviert¹⁰¹.

Insbesondere Lyn, Fyn und Src sind maßgeblich an thrombozytären Aktivierungsvorgängen beteiligt. Durch die Fyn- und Lyn-induzierte Tyrosinphosphorylierung in der ITAM-Region spielen die Src-Kinasen Fyn und Lyn eine wichtige Rolle im frühen Signalweg der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation, wie im Kapitel 2.6.1 ausführlich beschrieben²¹. Hierbei ist Lyn insbesondere für ein schnelles Einsetzen der Signalübertragung nach Ligandenbindung an GPVI zuständig, während Fyn eine dauerhafte Signalübertragung ermöglicht^{77, 87}. So zeigten sich in Experimenten mit genetisch modifizierten Mausthrombozyten ohne Lyn-Expression ein verzögerter Beginn der GPVI-induzierten Thrombozytenaktivierung^{87, 100-102}. Mausthrombozyten mit fehlender Fyn-Expression zeigten eine insgesamt reduzierte GPVI-vermittelte thrombozytäre Antwort mit Verminderung der Tyrosinphosphorylierung der FcR γ -Kette, der PLC γ 2-Aktivität, der Aggregation und der Sekretion¹⁰². Bei fehlender Expression von Lyn und Fyn oder Lyn und Src kam es zur weiteren Verzögerung und Abnahme der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung¹⁰⁰⁻¹⁰². In früheren Experimenten wurde eine vollständige Hemmung von GPVI-vermittelter Gestaltveränderung und Aggregation durch einen Src-Familien-Kinasen-Inhibitor PP1 in Mausthrombozyten nach Stimulation mit CRP beobachtet¹⁰². Außerdem wurde beschrieben, dass der Src-Familien-Kinasen-Inhibitor PD173952 die GPVI-abhängige Thrombozytenaktivierung und Aggregation im Blut von Maus und Mensch vollständig hemmen kann, wobei die Plättchen weiterhin mit G-Protein-Rezeptor-Agonisten Thrombin und ADP aktiviert werden können und Aggregate bilden⁴⁹. Es gibt jedoch Hinweise, dass Src-Familien-Kinasen in die Signalwege der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, wie des Thrombinrezeptors PAR-4 sowie des ADP-Rezeptors P2Y₁₂, involviert sind^{101, 103}. Im PAR-4-Signalweg sind Src-Familien-Kinasen an der Signalübertragung distal der PLC β und der Ca²⁺-Freisetzung beteiligt^{101, 103}. Zudem wurde beschrieben, dass die Interaktion von Src-Familien-Kinasen mit PKC die Aktivierung der PKC nach Stimulation mit Thrombin potenziert¹⁰¹. Durch eine direkte Interaktion von G_i-Protein mit Lyn und Fyn spielen diese Src-Familien-Kinasen eine wichtige Rolle im frühen Signalweg des ADP-Rezeptors P2Y₁₂¹⁰¹. Außerdem sind Src-Familien-Kinasen an der Initialisierung und Weiterleitung von Signalen nach Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ^{21, 100, 101} und GPIb-IX-V⁴⁹,

^{100, 101, 104} in humanen und murinen Thrombozyten beteiligt. Ferner wurde beschrieben, dass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ über Src-Kinasen-Phosphorylierung thrombozytäres *spreading* vermitteln kann⁹⁸.

Somit sind Src-Familien-Kinasen als Regulatoren von verschiedenen thrombozytären Signalwegen an der Plättchenaktivierung wesentlich beteiligt. Sie sind nicht nur in die Signalwege involviert, welche die Thrombusbildung initialisieren und stabilisieren, sondern tragen über die Signalweiterleitung via G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu der Verstärkung der Thrombozytenaktivierung bei¹⁰¹. Es wurde vorgeschlagen, dass die Src-Familien-Kinasen ein attraktives pharmakologisches *target* für die Entwicklung neuer antithrombozytärer Substanzen sein könnten.

In dieser Dissertation wurde die Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten untersucht. Dieser ist im Vergleich zu anderen Src-Familien-Kinasen-Inhibitoren wie PP1 und PP2 spezifischer.

2.7.2 Syk-Hemmer: Syk inhibitor II, R406

Syk (*spleen tyrosine kinase*; 72 kDa) ist eine zytoplasmatische Proteintyrosinkinase mit 2 Src-homologen Domänen (SH2), welche über eine Interdomäne A miteinander verknüpft sind. Eine der beiden SH2-Domänen ist durch eine Interdomäne B mit der carboxyterminalen Kinase-Domäne verbunden¹⁰⁵.

Syk ist in verschiedenen Zellen exprimiert. Insbesondere in hämatopoetischen Zellen ist die Syk an vielen Signalwegen essentiell beteiligt¹⁰⁵. So übermittelt Syk die Signale von T- und B-Zell-Rezeptoren, CD74, Fc-Rezeptoren, Integrin-Rezeptoren etc.¹⁰⁵ Dementsprechend ist die Syk in zahlreiche physiologische Vorgänge involviert, unter anderem in die Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems, der B-Zell-Reifung, der Leukozytenadhäsion, der Osteoklastenreifung und deren Funktion, sowie der Thrombozytenaktivierung und Angiogenese¹⁰⁵. Aufgrund seiner Rolle in vielen physiologischen Vorgängen ist Syk an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie Autoimmunkrankheiten (rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes (SLE), Immunthrombozytopenie (ITP), Sklerodermie), Allergien (allergische Rhinitis, Asthma bronchiale) und Malignomen (B-Zell-Leukämien, Lymphome), beteiligt^{105, 106}. Daher stellt Syk ein attraktives *target* bei Behandlung dieser Erkrankungen dar¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Wie im Kapitel 2.6.1 beschrieben, spielt Syk eine wichtige Rolle bei der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation^{21, 77, 78}. Syk wird durch Autophosphorylierung sowie durch Lyn- und Fyn-Kinasen phosphoryliert, was eine dauerhafte Syk-Aktivierung aufrechterhält und die Ablösung von Syk vom GPVI-FcR γ -Komplex ermöglicht^{21, 105, 107}. Nach Aktivierung leitet Syk – wie in Abschnitt 2.6.1

beschrieben – die nachgeschaltete Signalkaskade ein, welche zur Thrombozytenaktivierung (Aggregation und Sekretion) führt^{21, 77, 105-107}.

Außerdem ist Syk an den Signalwegen von anderen Thrombozytenrezeptoren beteiligt. So wurde gezeigt, dass Syk nach der *outside-in*-Aktivierung des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ aktiviert wird^{21, 81, 105}, wobei das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowohl Syk-vermittelt als auch unabhängig von Syk agieren kann²¹. Ferner wurde beschrieben, dass Syk beim Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -vermittelten Thrombozyten-*spreading* auf Kollagen involviert ist⁹⁸. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Syk nach Aktivierung von GPIb phosphoryliert wird¹⁰⁹.

Nachdem Syk, wie oben beschrieben, in viele pathophysiologische Prozesse involviert ist, stellt Syk ein attraktives *target* zur Behandlung verschiedener Erkrankungen dar. Ein bekanntes Beispiel eines klinisch intensiv erforschten Syk-Inhibitors ist R788, später umbenannt in Fostamatinib^{105, 106, 108}. Fostamatinib ist ein oral verfügbares wasserlösliches Prodrug einer biologisch aktiven Substanz R406, welche Syk reversibel hemmt, indem es mit deren ATP-Bindungsstelle kompetiert^{106, 110, 111}. R406 verzögerte die Entwicklung der experimentellen Arthritis in Tiermodellen^{111, 112}. In einer randomisierten Phase-II-Studie konnte die Aktivität der rheumatoiden Arthritis durch Fostamatinib signifikant reduziert werden¹¹³. Im Mausmodell eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) – einer Autoimmunerkrankung mit gestörter T- und B-Zell-Funktion und einer deutlich erhöhten Syk-Expression – konnten die Hautinflammation und der Nierenschaden durch R788 reduziert werden¹¹⁴. Auch bei Mäusen mit Sklerodermie begrenzte Fostamatinib Organschaden und Fibrose-Ausmaß¹⁰⁶. Darüber hinaus wirkte sich Fostamatinib auf die Therapie von non-Hodgkin-Lymphomen und chronisch lymphatischer Leukämie im Rahmen der Phase I- und II-Studien positiv aus^{107, 115}. In den klinischen Studien wurde Fostamatinib (R788) in der Dosis von 75 bis 150 mg zweimal täglich oder 150 mg 1x täglich verwendet^{113, 116}.

Zudem konnten Autoimmunerkrankungen mit Störung der Thrombozytenfunktion, wie die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP) und die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), welche durch Autoantikörper-vermittelte Thrombozytenaktivierung und -Elimination gekennzeichnet sind, durch Syk-Inhibitoren positiv beeinflusst werden^{106, 116}. In einer kleinen offenen Phase-II-Studie konnte durch Fostamatinib die Thrombozytenzahl bei 50 % der Patienten mit ITP dauerhaft normalisiert werden¹¹⁶.

Da Syk eine wichtige Rolle bei der GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung und Aggregation spielt^{21, 77}, könnte Syk ein attraktives *target* für die Entwicklung neuer antithrombozytärer Substanzen sein. Durch Syk-Inhibition mittels R406 konnte *in vitro* eine deutliche Hemmung der GPVI-abhängigen CRP-, Kollagen- und Convulxin-induzierten Gestaltveränderung und Aggregation in gewaschenen humanen Plättchen erreicht werden¹¹⁷. Gleichzeitig war der Effekt von R406 auf Thrombin- und ADP-vermittelte

Thrombozytenaktivierung vernachlässigbar bzw. gar nicht vorhanden¹¹⁷. In einer anderen Studie, die eine Reduktion der Immunkomplex-vermittelten Gelenkentzündung nach oraler Gabe von R406 zeigte, wurde kein Einfluss auf die Schwanzblutungszeit bei Mäusen festgestellt¹¹¹. In derselben Studie wurde aber auch keine Wirkung auf die Kollagen-vermittelte Aktivierung von menschlichen Thrombozyten nach oraler Einnahme von R406 gefunden¹¹¹. Eine weitere Studie ergab eine deutliche Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation nach *in vitro* Zugabe eines anderen Syk-Inhibitors PRT0603318 in das menschliche PRP, auch hier ohne Effekt auf ADP-induzierte Aggregation¹¹⁸. Zudem wurde die Convulxin-induzierte Thrombozytenaggregation *ex vivo* nach einer Infusion von PRT0603318 in Schweinen vollständig gehemmt, ohne Verlängerung der Ohrblutungszeit¹¹⁸. Darüber hinaus konnte durch Syk-Inhibition nach oraler oder intravenöser Gabe von PRT0603318 die arterielle Thrombose *in vivo* in verschiedenen Tiermodellen ohne wesentlichen Einfluss auf die Hämostase gehemmt werden¹¹⁸. Auch in anderen tierexperimentellen Ansätzen wurde nach Syk-Inhibition keine Verlängerung der Blutungszeit beobachtet^{119, 120}. In einer Studie von Van Eeuwijk *et al.* führte ein oral verabreichter selektiver Syk-Inhibitor BI1002494 zur Verkleinerung des Infarkt-Areals und zur Verbesserung der neurologischen Folgen einer induzierten zerebralen Ischämie bei Mäusen, ohne dass die Schwanzblutungszeit negativ beeinflusst wurde¹¹⁹. Auch bei den Mäusen mit fehlender Syk-Expression in ihren Thrombozyten zeigte sich eine normale Schwanzblutungszeit¹²¹. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde auch in klinischen Studien unter Syk-Inhibitoren kein Anstieg des Blutungsrisikos beobachtet^{107, 122}.

In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurde gezeigt, dass unter hohem Scherstress (bis zu 100 dyn/cm²), welcher typischerweise an atherosklerotisch verengten Gefäßstellen vorliegt, Syk an den Tyrosin-Resten 525/526 und 352 vermehrt phosphoryliert wird und die Scher-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* vermittelt¹²³. Dementsprechend wurde nach Vorinkubation mit Syk-Inhibitoren OXSI-2 oder Piceatannol eine Reduktion der Scher-induzierten Syk-Phosphorylierung und Thrombozytenaggregation in gewaschenen Thrombozyten unter Scherstress von 40 sowie 100 dyn/cm² sowie eine Hemmung der Thrombusbildung auf Kollagen Typ III in humanem Vollblut unter erhöhtem Scherstress von 40 dyn/cm² beobachtet¹²³. Diese Erkenntnisse ließen die Autoren vermuten, dass durch Syk-Inhibition eine effektive Hemmung der Atherothrombose erreicht werden könnte.

In dieser Dissertation wurde außer dem klinisch intensiv erforschten R406 ein weiterer Inhibitor von Syk untersucht – der Syk Inhibitor II. Dieser ist ein Pyrimidin-5-Carboxamid-Derivat, welches Syk *in vitro* mit IC₅₀ von 41 nM effektiv und selektiv hemmt¹²⁴. Syk Inhibitor II ist ein reversibler ATP-kompetitiver Inhibitor von Syk¹²⁴.

2.7.3 Btk-Hemmer: Ibrutinib (Imbruvica®), Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059

Bruton's Tyrosinkinase, auch Btk genannt, spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Proliferation von Prä-B-Zellen und B-Lymphozyten. Btk wird nach B-Zell-Rezeptoraktivierung phosphoryliert und fördert die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern. Die Rolle der Btk-Kinase im *Signaling* des B-Zell-Antigen-Rezeptors wurde erstmalig bei Patienten mit X-chromosomaler Agammaglobulinämie (XLA) entdeckt. Diese Störung basiert auf einem genetischen Mangel oder einer funktionsbeeinträchtigenden Mutation von Btk, welche zu einer starken Reduktion der PLC γ 1-Aktivierung durch den B-Zell-Rezeptor in der B-Zellentwicklung und dadurch zu einem Mangel an reifen B-Lymphozyten führt²¹.

Btk-Inhibitoren hemmen die Funktion und Proliferation von B-Zellen. Eine Reihe von oral applizierbaren, Btk-selektiven irreversiblen niedermolekularen („*small molecule*“) Inhibitoren wird derzeit in klinischen Studien getestet oder ist bereits für die Therapie zugelassen. Zum Beispiel Ibrutinib (Imbruvica®, PCI-32765) ist ein potenter Btk-Hemmer der ersten Generation, welcher kovalent an den Cystein-Rest Cys-481 der Btk bindet und diese irreversibel inaktiviert¹²⁵. Ibrutinib ist derzeit zur Therapie von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), kleinzelligem B-Zell-Lymphom, Mantelzelllymphom (MCL), und Morbus Waldenström sowie seit vor kurzem zur Therapie von *Graft-versus-Host-Reaktion* zugelassen¹²⁶⁻¹²⁹. Mittlerweile existieren Btk-Inhibitoren der zweiten Generation, welche in klinischen Studien untersucht werden: Acalabrutinib wird für die Behandlung eines CLL-Rezidivs (Phase III) getestet und ist seit November 2017 als Calquence® zur Behandlung des MCL in den USA zugelassen, ONO/GS-4059 zeigte sich effektiv und gut verträglich für die Therapie von non-Hodgkin-Lymphomen und/oder CLL (Phase I)¹³⁰, Spebrutinib (AVL-292, CC-292; Phase I) und BGB-3111 (Phase I) werden für die Behandlung von CLL untersucht¹³¹. Weitere reversible und irreversible Btk-Inhibitoren, wie CNX-774, Imidazoquinoxaline, CGI1746, GDC-0834, RN486, befinden sich in der Entwicklung für die Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis¹³².

Ibrutinib ist auch in der Lage, die Funktion der Thrombozyten zu hemmen. Btk spielt eine wichtige Rolle in der Kollagen/GPVI- und vWF/GPIb-stimulierten Signaltransduktion in den Thrombozyten^{88, 89, 133} (siehe Abschnitt 2.6.1). Zudem wurde berichtet, dass Btk im *outside-in*-Signalweg des Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, welcher bei der Thrombin-induzierten Thrombozytenaggregation sowie bei der Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen aktiviert wird, involviert ist^{134, 135}.

Dementsprechend konnte eine Hemmung der Kollagen- und vWF-abhängigen Thrombozytenfunktion unter statischen sowie arteriellen Flußbedingungen *in vitro* und *ex vivo* bei Patienten unter Ibrutinib-

Therapie gezeigt werden¹³⁶⁻¹³⁸. Nach Zugabe von Ibrutinib *in vitro* oder in Patienten unter Ibrutinib-Therapie *ex vivo* zeigte sich eine Hemmung der Kollagen- oder CRP-stimulierten Thrombozytenaggregation in PRP, Hemmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation im Blut (Ristocetin vermittelt die Interaktion von vWF mit GPIb) sowie eine Inhibition der Kollagen- und vWF-induzierten Thrombusbildung unter Fluss¹³⁵⁻¹³⁸. Zudem wurde gezeigt, dass der *outside-in*-Signalweg von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und die anschließende Thrombozytenadhäsion und Ausbreitung auf immobilisiertem Fibrinogen *in vitro* durch Ibrutinib gehemmt wird¹³⁵.

Im Vergleich zur Standardchemotherapie war bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie eine Hemmung der Kollagen/GPVI- und der vWF/GPIb-induzierten thrombozytären Aggregation mit einem erhöhten Blutungsrisiko assoziiert¹³⁶⁻¹³⁹. Interessanterweise wurden unter Therapie mit neueren, selektiveren Btk-Inhibitoren der zweiten Generation, wie Acalabrutinib, ONO/GS-4059 und BGB-3111 weniger Blutungskomplikationen als unter Ibrutinib-Therapie beschrieben¹³¹. Auch nach oraler Verabreichung der neuen Btk-Inhibitoren BTKI-43607 und BTKI-43761 an nicht-humane Primaten für 10 Tage ließ sich keine Verlängerung der Hautblutungszeit und keine Beeinträchtigung der Koagulation feststellen¹⁴⁰. Bemerkenswerterweise zeigten Thrombozyten von XLA-Patienten eine reduzierte Phosphorylierung von PLC γ 2 und Aggregation nach Stimulation mit niedrigen Konzentrationen von Kollagen oder CRP, während die Aggregation nach Zugabe anderer Thrombozytenstimuli normal war¹³³. Diese Patienten weisen keine erhöhte Blutungsneigung auf¹⁴¹.

In dieser Dissertation wurden die thrombozytären Wirkungen der Btk-Inhibitoren Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 untersucht.

2.8 Mechanismen der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenadhäsion und Aggregation

Kollagen, das am häufigsten vorkommende Strukturprotein des menschlichen Körpers, stellt eine wichtige organische Komponente der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes, inklusive der Blutgefäße, dar⁷⁹. Derzeit sind 29 verschiedene Kollagentypen bekannt⁷⁹. Die fibrillären Kollagentypen I und III sind die wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix der Gefäßwand und gleichzeitig der Hauptaktivator der Thrombozyten nach Endothelschädigung⁷⁹. Das netzbildende Kollagen Typ IV stellt den Hauptbestandteil der subendothelialen Basallamina dar⁶. Insgesamt werden 9 Kollagentypen, nämlich I, III-VI, VIII, XII, XIII und XIV, in der Gefäßwand exprimiert⁶. Das in unseren Experimenten verwendete Horm®-Kollagen ist eine Suspension von nativem fibrillärem Pferde-Sehnen-Kollagen, und enthält Typ I und Typ III Kollagen, mit einem kleinen Anteil an anderen extrazellulären Matrixproteinen⁶.

Die Primärstruktur aller Kollagene besteht aus repetitiven GXY-Sequenzen, wobei sich an jeder dritten Position ein Glycin(G)-Rest befindet. Die Position X wird oft mit Prolin (P) und die Position Y mit Hydroprolin (O) besetzt^{6, 79}. Eine Polypeptidkette besteht aus ca. 1000 aneinander gereihten Aminosäuren und bildet eine linksgängige Helix (α -Kette)⁶. Drei α -Ketten lagern sich in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix (entspricht einem Kollagenmolekül), auch als Tropokollagen bezeichnet, aneinander. Diese können identisch, wie bei Kollagen Typ III (3 α 1-Ketten), oder unterschiedlich, wie bei Kollagen Typ I (2 α 1-Ketten und 1 α 2-Kette) sein⁷⁹. Bei fibrillären Kollagenen, nämlich Typ I-III, V, XI, XXIV und XXVII, lagern sich die einzelnen Kollagenmoleküle in charakteristischer Art und Weise *side-by-side* und *end-to-end* aneinander, sodass eine hochmolekulare Kollagenfaser entsteht⁷⁹.

Fibrilläres Kollagen ist von essentieller Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion und Aktivierung nach Endothelschädigung. Fibrilläres Kollagen bindet und aktiviert zwei Thrombozytenrezeptoren – GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ ^{11, 49, 79}. Im Gegensatz zum fibrillären Kollagen bindet das lösliche Kollagen ausschließlich an Integrin $\alpha_2\beta_1$ von aktivierten Thrombozyten⁹⁴. Lösliches Kollagen ist nicht in der Lage, mit ruhenden Plättchen zu interagieren⁹⁴.

Die Zusammensetzung von atherosklerotischen Plaques unterscheidet sich von der Zusammensetzung einer gesunden Gefäßwand, wie im Abschnitt 2.4 ausführlich beschrieben. Die entscheidenden plättchenaktivierenden Komponenten atherosklerotischer Plaques stellen morphologisch heterogene Kollagenfasern Typ I und Typ III dar, welche über die Aktivierung von GPVI die Thrombusbildung induzieren^{8, 42, 50}.

Der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI vermittelt unter statischen Bedingungen sowohl die durch Plaque als auch die durch fibrilläres Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation⁵⁰. Unter arteriellen Flussbedingungen spielt das Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern und ergänzt die Funktion von GPVI bei der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation^{11, 49, 50, 79}. Dies ähnelt der Situation nach Gefäßwandverletzung in einem gesunden Blutgefäß. Im Gegensatz dazu stimulieren die Kollagenstrukturen von atherosklerotischen Plaques die Thrombusbildung unter arteriellem Fluss ausschließlich über die Aktivierung des GPVI^{8, 50}. Das Integrin $\alpha_2\beta_1$ spielt bei der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation keine Rolle^{8, 50}. Somit könnte die GPVI-Inhibition ein effektiver und selektiver therapeutischer Ansatz für die Prävention der Atherothrombose bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko darstellen.

2.9 Neue Strategien für antithrombozytäre Therapien

In den letzten Jahren werden das GPVI und das GPIb als mögliche pharmakologische *targets* einer zukünftigen antithrombozytären Therapie intensiv erforscht. Derzeit werden GPVI- sowie vWF/GPIb-hemmende Substanzen in klinischen Studien getestet¹⁴². Im Folgenden wird auf beide plättchenhemmende Ansätze näher eingegangen.

Nachdem GPVI ausschließlich in Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert wird, wäre durch die GPVI-Inhibition eine selektive Plättchenhemmung möglich. Durch Blockade von Kollagen-Bindungsstellen von GPVI mittels Anti-GPVI-Antikörper zeigte sich bei Mäusen¹⁴³ und Ratten¹⁴⁴ *in vivo* eine effektive Hemmung der arteriellen Thrombose nach Karotisverletzung. Nach intravenöser Applikation von Anti-GPVI-Antikörpern wurde die Blutungszeit in verschiedenen Tiermodellen ähnlich wie bei genetisch modifizierten Mäusen mit fehlender GPVI-Expression nicht oder nur leicht verlängert¹⁰. Bei Menschen kommen Erkrankungen mit strukturellen oder funktionellen GPVI-Defekten sehr selten vor und können sowohl genetisch-bedingt, zum Beispiel durch fehlende oder zu niedrige GPVI-Expression mit gestörtem *Signaling*, als auch erworben sein, beispielsweise durch Bildung von Anti-GPVI-Autoantikörpern¹⁴⁵. Humane Thrombozyten mit GPVI-assoziierten Defekten sind nicht in der Lage, auf Kollagenstimulation zu aggregieren, während die Reaktion auf andere Stimuli wie vWF/Ristocetin oder ADP normal ist¹⁴⁵. Dennoch wurden bei manchen Patienten mit GPVI-assoziierten Defekten Blutungsereignisse beschrieben, die durch gleichzeitig vorliegende Thrombozytopenie erklärt werden könnten¹⁴⁵. Ähnlich führte eine selektive Antikörper-vermittelte Depletion von GPVI bei Mäusen zur GPVI-Elimination von der

Thrombozytenoberfläche und einer transienten Thrombozytopenie und dadurch zur signifikanten Verlängerung der Blutungszeit^{10, 81, 142, 146}.

Insgesamt gilt die Inhibition des GPVI-Signalweges als ein potentiell sicherer und effektiver Ansatz für die Entwicklung neuer antithrombozytärer Substanzen. Derzeit wird ein rekombinantes dimeres Fusionsprotein GPVI-Fc (150 kDa) in klinischen Studien getestet^{142, 147, 148}. Dieses besteht aus einer extrazellulären Domäne eines humanen GPVI-Moleküls, einer kurzen Linker-Sequenz und einem Fc-Teil des humanen IgG₁ und bindet an spezifische Bindungsstellen an Kollagen und verhindert dadurch die Interaktion von Kollagen mit GPVI¹⁴². In einer klinischen Phase-I-Studie mit gesunden Probanden wurde nach intravenöser Applikation von GPVI-Fc (Revacept®) eine Dosis-abhängige Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation *ex vivo* beobachtet, während die ADP- und TRAP-stimulierte Thrombozytenantwort nicht beeinflusst wurde¹⁴⁹. Auch wurde unter Revacept® keine signifikante Verlängerung der Blutungszeit festgestellt^{142, 149}. GPVI-Fc wird derzeit für die Behandlung von akutem ischämischen Schlaganfall, symptomatischer Karotisstenose, TIA und Amaurosis fugax im Rahmen einer Phase-II-Studie untersucht¹⁴⁷. In einer weiteren Phase-II-Studie wird der Einsatz von Revacept® bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, die sich einer elektiven PCI unterziehen, untersucht¹⁴⁸. Eine neuerliche Studie zeigte, dass die antithrombotische Wirkung von GPVI-Fc durch Quervernetzung von GPVI-Fc mittels Anti-Fc-Antikörper weiter verbessert werden kann¹⁵⁰.

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung antithrombozytärer Therapien stellt die Inhibition des vWF/GPIb-Signalweges dar^{142, 151}. Zwar können bei Patienten mit vWF-Mangel oder vWF-Defekt (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) bzw. GPIb-Mangel oder -Dysfunktion (Bernard-Soulier-Syndrom) erhebliche Blutungskomplikationen auftreten, andererseits können vWF/GPIb-hemmende Substanzen die arterielle Thrombose ohne Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase hemmen¹⁴².

In den letzten Jahren werden bzw. wurden Antagonisten von vWF zur Behandlung von Thrombozytopathien klinisch getestet¹⁴². ALX-0081, ein humanisierter Anti-vWF-Nanoantikörper, auch Capalizumab genannt, wird für die Therapie von thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) in einer Phase-III-Studie derzeit untersucht¹⁵². ARC1779, ein Anti-vWF-Aptamer, zeigte Vorteile bei der Behandlung von TTP und von-Willebrand-Syndrom Typ 2b (eine Form des von-Willebrand-Syndroms, bei der der defekte vWF eine erhöhte Affinität zum GPIb aufweist, was zur Thrombozytopenie führt), ohne Blutungskomplikationen auszulösen (Phase-II-Studie)^{153, 154}. Weitere Studien mit ARC1779 wurden wegen zu langsamer Patienten-Rekrutierung bzw. Wegfallen der Sponsor-Unterstützung gestoppt^{155, 156}.

Da der vWF/GPIb-Signalweg von großer Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion insbesondere unter Flussbedingungen mit hohen Scherraten ist, wie sie in atherosklerotisch stenosierte Arterien vorkommen, könnten Antagonisten von vWF bzw. GPIb effektiv und selektiv zur Hemmung der Atherothrombose eingesetzt werden. Der oben erwähnte Anti-vWF-Nanoantikörper ALX-0081 zeigte bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, NSTEMI und stabiler Angina pectoris weniger Blutungskomplikationen im Vergleich zu Abciximab (Phase-II-Studie)¹⁵⁷. Der GPIb-Antagonist Anfibatide (ein Schlangengiftderivat), welcher die Bindung von vWF als auch Thrombin an GPIb blockiert, wurde in einer Phase-II-Studie in Bezug auf Sicherheit und Wirksamkeit bei NSTEMI-Patienten untersucht und führte zu keiner signifikanten Verlängerung der Blutungszeit¹⁵⁸. Andere GPIb-Antagonisten, wie h6B4-Fab und GPG-290, befinden sich in präklinischer Entwicklung¹⁵⁸.

Interessanterweise konnte die Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen *in vitro* durch rekombinantes GPVI-Fc, GPVI-Antikörper sowie durch GPIb-Antikörper effizienter als durch die derzeit breit eingesetzten ASS und P2Y₁₂-Antagonisten gehemmt werden^{48, 159}. Somit könnte die Inhibition von GPVI, GPIb und vWF die aktuell verfügbare antithrombozytäre Therapie effizienter machen^{8, 50, 142, 159}.

3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die moderne thrombozytenhemmende Therapie geht mit einem erhöhten Blutungsrisiko einher. Um die Effektivität der etablierten antithrombozytären Therapie mit ASS (Aspirin®) und P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten ohne wesentlichen Anstieg des Blutungsrisikos zu verbessern, wären neue Substanzen, welche die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung effektiv und spezifisch, ohne Einfluss auf die physiologische Hämostase hemmen, sehr wünschenswert. Nachdem der thrombozytäre GPVI-Rezeptor, und nicht das Integrin $\alpha_2\beta_1$, die zentrale Rolle bei der Atherothrombose spielt und seine Funktion bei der physiologischen Hämostase durch Aktivierung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ kompensiert werden kann, könnte die Inhibition des GPVI-Signalweges einen derartigen Ansatz darstellen. In dieser Dissertation wurden verschiedene Inhibitoren von Tyrosinkinasen, welche im GPVI-induzierten Signalweg eine wichtige Rolle spielen, untersucht.

Das erste Ziel war es, die Effekte von Inhibitoren der Src-Familien-Kinasen (PD173952) und der Syk-Kinase (Syk Inhibitor II, R406) auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen und unter arteriellen Flussbedingungen zu untersuchen. Die Src-Kinase Lyn und Syk spielen eine wichtige Rolle im frühen GPVI-Signalweg und sind funktionell viel weniger in die Thrombozytenaktivierung durch die Agonisten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wie Thrombin und ADP, involviert⁷⁷.

Das nächste Ziel war es, die Wirkung der irreversiblen Inhibitoren der Btk Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 auf die Plaque- und Kollagen-stimulierte Thrombozytenaktivierung unter statischen und arteriellen Flussbedingungen zu testen. Nachdem die *in vitro* Experimente vielversprechende Ergebnisse erbrachten, stellte sich die Frage, ob eine Plaque-selektive Hemmung der Thrombozytenaggregation *ex vivo* nach Einnahme von Btk-Inhibitoren besteht. Hierfür wurde das Blut von Patienten mit CLL und MCL unter oraler Therapie mit Ibrutinib (Imbruvica®) untersucht. Zudem erfolgte die Testung der Blutungszeit mittels PFA-100. Da das Ibrutinib als irreversibler Btk-Inhibitor die Thrombozyten für ihre gesamte Lebensdauer hemmen müsste, stellte sich die Frage, ob Ibrutinib auch in niedriger Dosierung eine selektive Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung bewirken kann.

Zur Klärung des Mechanismus der Plaque-selektiven Hemmung der Thrombozytenaggregation wurden die Wirkungen der Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Sekretion untersucht. Außerdem stellte sich die Frage, ob die Btk-Inhibition die Integrin- $\alpha_2\beta_1$ - und vWF-abhängige Thrombozytenadhäsion an Kollagen, welche für die physiologische Hämostase wichtig sind, beeinflusst.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Antikörper, Hemmsubstanzen und Chemikalien

Primärantikörper

Anti-Integrin $\alpha_2\beta_1$	6F1 (monoklonaler IgG1-Antikörper einer Maus)	Geschenk von Dr. Barry Collier (Rockefeller University, New York, USA)
Anti-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	Abciximab (ReoPro®, Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers gegen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)	Janssen Biologicals B.V. (Leiden, Niederlande)
Anti-GPIIb/IIIa -Antikörper	6B4 (monoklonaler IgG1-Antikörper einer Maus)	Geschenk von Prof. H. Deckmyn (Laboratory for Thrombosis Research, IRC, KU Leuven Campus Kortrijk, Kortrijk, Belgium)

Niedermolekulare Tyrosinkinasehemmer

Src-Familien-Kinasen-Inhibitor	PD173952	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Syk-Inhibitoren	R406	Selleckchem (Houston, USA)
	Syk Inhibitor II	Calbiochem (San Diego, USA)
Btk-Inhibitoren	Acalabrutinib (ACP-196)	Selleckchem (Houston, USA)
	Ibrutinib	Selleckchem (Houston, USA)
	Ibrutinib Hartkapseln (Imbruvica®)	Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgien
	ONO/GS-4059	Selleckchem (Houston, USA)

Chemikalien

Acetylsalicylsäure (ASS) Tabletten	1 A Pharma (Oberhaching, Deutschland)
------------------------------------	---------------------------------------

Materialien und Methoden

Adenosin 3-phosphat 5-phosphat (ADP)	Biopool (Wicklow, Irland)
Arachidonsäure (AA)	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
DiOC6	Life Technologies (Eugene, OR, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Humanes Serumalbumin (HSA, Katalog #: A1653)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kollagen (Horm®)	Takeda (Linz, Österreich)
Luciferine-luciferase Reagent (Chronolume®)	Chronolog Corp. (Havertown, PA, USA)
Lösliches Kollagen Typ I (aus Kalbshaut)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Mepacrine	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
PAR-4-Agonist Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-NH ₂ (AY-NH ₂)	Tocris (Avonmouth, Bristol, Großbritannien)
Ristocetin	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Tissue-Tek® (Einbettmedium für die Kryotomie)	Sakura (Alphen aan den Rijn, Niederlanden)
TRAP (SFLLRN, Protease-aktivierter Rezeptor-1-Agonist)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
U-46619 (TxA ₂ -Rezeptor-Agonist)	Calbiochem (San Diego, USA)

4.1.2 Puffer und Lösungen

Homogenisierungspuffer *	150 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,4
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HSA-PBS*	HSA 4 % oder HSA 0,5 % in PBS
Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	B. Braun (Melsungen, Deutschland)

Refludan® (Rekombinantes Lepirudin)**	gelöst in 0,9 % NaCl, Stock ~ 100000 U/ml; 6,45 mg/ml; Stock bei -20°C gelagert; finale Konzentration im Blut ~ 200 U/ml; 13 µg/ml Celgene (Windsor, Großbritannien)
SKF-Puffer	Takeda (Linz, Österreich)

* Eigene Herstellung

** Lagerung bei +4°C

4.1.3 Stammlösungen

Acalabrutinib (ACP-196)	Stammlösung 20 mM im DMSO*; vor jedem Experiment Zwischenverdünnungen (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM) im DMSO hergestellt; finale Konzentration der Btk-Hemmer im Blut 0,1 µM, 0,2 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM bzw. 5 µM **
Ibrutinib	
ONO/GS-4059	
PD173952	Stammlösung 20 mM im DMSO*; vor jedem Experiment Zwischenverdünnungen (1 mM, 2 mM, 5 mM und 10 mM) im DMSO hergestellt; finale Konzentration des Hemmers im Blut 1 µM, 2 µM, 5 µM bzw. 10 µM **
R406	Stammlösungen 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM im DMSO*; finale Konzentration des Hemmers im Blut 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM in den Aggregometrie-Experimenten; 5 µM, 10 µM und 15 µM in den Flussexperimenten **
Syk Inhibitor II	Stammlösung 4 mM in aqua destillata*; anschließend Verdünnung im 0,9 % NaCl im Verhältnis 1:1 auf 2 mM; Endkonzentrationen im Blut 1 µM, 2 µM, 5 µM und 10 µM
ADP	500 µM in aqua destillata
DiOC6	Stammlösung 5 mM im DMSO; vor jedem Experiment Verdünnung im HSA 0,5 % -PBS auf 100 µM; finale Konzentration im Blut 1 µM
Fibrilläres Horm®-Kollagen	100 µg/ml im SKF-Puffer für die Aggregometrie-Experimente; 20 µg/ml im SKF-Puffer für die Flussexperimente

Materialien und Methoden

TRAP	500 μ M im 0,9 % NaCl
U46619 (TxA ₂ -Rezeptor-Antagonist)	Stammlösung 10 mM im Ethanol; Verdünnung im NaCl 0,9 % auf 100 μ M; finale Konzentration im Blut 300 nM

* Tyrosinkinase-Inhibitor-Stammlösungen wurden bei -80°C (Acalabrutinib, Ibrutinib, ONO/GS-4059, R406), bei -20°C (Syk Inhibitor II) sowie bei +4°C (PD173952) gelagert.

** Finale Konzentration von DMSO im Blut war stets 0,1 %.

4.1.4 Verbrauchsmaterialien

Butterflykanülen (20-Gauge)	Intermedica GmbH (Mainz, Deutschland)
Falcon® Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Deckgläschen	Deckgläser 24 x 60 mm, # 1,5H, Menzel-Gläser GmbH (Braunschweig, Deutschland)
Kollagen/ADP-Kartuschen und Kollagen/Epinephrin-Kartuschen für PFA-100	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)
Multiplate®-Testzellen	Dynabyte Medical (München, Deutschland)
Plastikspritzen, Spritzenvolumen 10 ml, 20 ml und 50 ml	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Silikonschlauch (Innen Φ : 1,5 mm; Außen Φ : 3,5 mm; Wanddicke: 1 mm)	Wagner & Munz GmbH (München, Deutschland)
S-Monovette® 3,8 ml 9NC/PFA (0,129 mol/l gepuffertes Natriumcitrat; pH 5,5)	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Flusskammern sticky-Slide I 0,1 Luer (Kanalvolumen: 25 μ l, Länge: 50 mm, Breite: 5 mm, Höhe: 100 μ m)	ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
Thrombo-Plus® Röhrchen für die direkte Zählung der Thrombozyten	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)

4.1.5 Geräte und Software

Impedanzaggregometer	Multiplate®-Analyzer, Dynabyte Medical (München, Deutschland)
Inkubator	WTB Binder (Tuttlingen, Deutschland)

Innovance® PFA-100 System	Siemens Healthcare (Erlangen, Deutschland)
Kamera	CoolSNAP HQ2 CCD camera, Photometrics (Tuscon, AZ, USA)
Mikroskope	Nikon Eclipse TE2000-E invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Tokyo, Japan) Leitzmikroskop Leitz Wetzlar (Wetzlar, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer; Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 m ²	Neubauer improved (Marienfeld, Deutschland)
Spritzensaugpumpe	LEGATO 270, Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Vortex	REAX top, Heidolph (Kehlheim, Deutschland)
Waagen	BP2100S und R160P, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasseraufreinigungssystem	Milli Q Direct Q 16, Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
NIS-element 3.2	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
ZEN Software	Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland)
Kryostat	Leica CM 3050S (Wetzlar, Deutschland)

4.2 Methoden

4.2.1 Blutentnahmen für *in vitro* und *ex vivo* Experimente

Für die *in vitro* Experimente wurde das Blut von gesunden freiwilligen Erwachsenen erhalten, die zumindest in den zwei Wochen davor keine thrombozytenhemmende Medikation zu sich genommen hatten. Die Probanden und Patienten stimmten nach einer ausführlichen Aufklärung der experimentellen Verwendung ihrer Blutproben zu und unterschrieben ein nach Beratung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München (AZ 365-14) erstelltes Informations- und Einwilligungsschreiben. Für die periphere Venenpunktion wurde eine 20-Gauge-Butterflykanüle verwendet. Nachdem die ersten 2 ml Blut verworfen wurden, wurde das venöse Blut für die Experimente in eine Plastikspritze gesammelt, welche vor der Blutentnahme zu 1/10 des Spritzenvolumens mit

rekombinantem Lepirudin gefüllt wurde (gelöst im 0,9 % NaCl, finale Konzentration im Blut ~ 200 U/ml; 13 µg/ml). Anschließend wurden die Experimente zwischen 20 Minuten und 4 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt.

Für die *ex vivo* Experimente wurde das venöse Blut von 5 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) unter Dauertherapie mit Ibrutinib (Imbruvica®; 3 x 140-mg-Kapseln täglich; Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgien) untersucht. Die Kontrollgruppe bestand aus 4 Patienten mit CLL und einem Patienten mit Mantelzelllymphom (MCL), bei welchen zum Zeitpunkt unserer Untersuchung keine Indikation zur Ibrutinib-Therapie bestand. Die Voraussetzung für die Teilnahme waren Thrombozytenzahlen $> 150 \times 10^9/\text{L}$ sowie keine thrombozyten- und gerinnungshemmende Medikation. Bei jedem Experiment wurde jeweils das Blut eines Patienten unter Ibrutinib-Therapie und eines Kontrollpatienten mit ähnlichen Thrombozytenzahlen parallel getestet.

Zur Untersuchung von Ibrutinib als einer möglichen antithrombozytären Therapie wurde ein Pilot-Versuch mit 2 freiwilligen gesunden männlichen Probanden (Ärzte im Alter von 66 und 61 Jahren) durchgeführt. Nachdem die beiden Probanden eine Initialdosis von Imbruvica® (3 x 140 mg) zu sich genommen hatten, erfolgte jeweils eine Woche lang die Einnahme einer niedrigen Dosis (Proband A 140 mg/Tag bzw. Proband B 140 mg jeden zweiten Tag).

Zum Vergleich wurde eine Versuchsreihe mit 2 Probanden (Arzt, 66 Jahre und Ärztin, 28 Jahre) durchgeführt, die niedrig-dosierte ASS (100 mg täglich) für 1 Woche eingenommen hatten, wobei der Proband A derselbe wie in den *ex vivo* Ibrutinib-Versuchen war.

Zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion am PFA-100-Gerät wurde Citrat-antikoaguliertes Blut verwendet, das in Fertigmonovetten (S-Monovette 9NC/PFA 3,8 ml), die 0,38 ml gepuffertes Natriumcitrat (0,129 mol/l; pH 5,5) enthielten, abgenommen wurde.

4.2.2 Thrombozytenzählung

Bei jedem Probanden wurde die Thrombozytenzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden vor jedem Experiment 10 µl Blut in die Thrombo-Plus® Fertigröhrchen für die direkte Zählung der Thrombozyten pipettiert und durch Schwenken mit der Flüssigkeit (Hg-Salz; 2,5 mg/ml Lösung) vermischt. Anschließend wurde je ein Tropfen von der entstandenen Lösung auf die beiden Felder der Neubauer-Zählkammer aufgetragen und mit dem dazugehörigen Deckgläschen bedeckt. Für die Auszählung wurde Leitz-Mikroskop (Wetzlar, Deutschland) verwendet.

4.2.3 Präparation, Konservierung und Aufbewahrung von humanem atherosklerotischen Plaquematerial

Atherosklerotisches Plauegewebe stammte von Patienten mit hochgradiger Karotisstenose und wurde nach Endarterektomie durch Herrn Professor Brandl (Praxis für Gefäßchirurgie und Venenmedizin am Marienplatz, München) freundlicherweise bereitgestellt. Entsprechend der Deklaration von Helsinki hatten die Patienten nach ärztlicher Aufklärung der Spende ihres Plauegewebes zugestimmt und ein nach Beratung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München (AZ 365-14) erstelltes Informations- und Einwilligungsschreiben unterschrieben. Die atheromatösen Plaques wurden sorgfältig unter sterilen Bedingungen vom umgebenden atherosklerotischen Gewebe getrennt und bis zur weiteren Verarbeitung unter -80°C aufbewahrt^{8, 42, 160}. Das Plauegewebe wurde verarbeitet, um Plauehomogenat oder $3\text{ }\mu\text{m}$ -dünne Schnitte zu erhalten.

Um Plauehomogenat herzustellen, wurden die Plaueproben abgewogen und unter sterilen Bedingungen im Homogenisierungspuffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) homogenisiert (Endkonzentration 100 mg Feuchtgewicht pro ml). Um mögliche Unterschiede zwischen Plaques von verschiedenen Patienten zu minimieren, wurden Pools aus 5 verschiedenen Plaques hergestellt, aliquotiert und unmittelbar bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt^{150, 159, 161}. In dieser Dissertation wurden 5 verschiedene Plaue-Pools eingesetzt. Vor der Verwendung wurden die Plauehomogenate für statische Untersuchungen im Multiplate®-Aggregometer sowie im Lumi-Aggregometer mit PBS im Verhältnis 1:1 sowie für die Flussexperimente im Verhältnis 1:20 verdünnt.

Zur Herstellung von sequentiellen Plaue-Gewebeschnitten wurden atherosklerotische Gewebeproben von 4 verschiedenen Patienten in Tissue-Tek® eingebettet, quer in $3\text{ }\mu\text{m}$ dünne Schnitte bei -20°C mittels Kryostat (Leica CM 3050S, Wetzlar, Deutschland) geschnitten und auf Deckgläschen aufgetragen. Die Plaue-Gewebeschnitte wurden bei -80°C gelagert.

4.2.4 Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen

Die Thrombozytenaggregation im Blut wurde mittels Impedanzaggregometrie (*multiple electrode aggregometry*, MEA) unter Verwendung eines Multiplate®-Aggregometers gemessen, wie initial beschrieben¹⁶². Es wurde das Protokoll von Bampalis et al. verwendet, um die Spontanaggregation möglichst gering zu halten¹⁶³.

PD173952, Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196), ONO/GS-4059, R406 oder DMSO als Kontrolle wurden zu 0,3 ml NaCl in die MEA-Küvetten pipettiert. Anschließend wurden 0,3 ml Blut in die Testküvette

zugegeben. Die Endkonzentration von DMSO betrug stets 0,1 %. Syk Inhibitor II wurde direkt zu der Mischung aus 0,3 ml NaCl und 0,3 ml Blut zugesetzt. Als Kontrolle wurde für Syk Inhibitor II NaCl verwendet. Finale Konzentrationen der Tyrosinkinaseinhibitoren in der Testküvette sind im Abschnitt 4.1.3 angegeben. Je nach Substanz wurden die Proben unterschiedlich lang bei 37°C ohne Rühren vorinkubiert: Syk Inhibitor II, PD173952 und R406 für 3 min, Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 für 15 min. In den *ex vivo* Experimenten mit dem Blut von Patienten bzw. gesunden Freiwilligen im Pilotversuch wurden die Proben bei 37°C für 3 min ohne Rühren vorinkubiert¹⁶³. Danach wurde der jeweilige Stimulus zugesetzt, das Rühren wurde initiiert und die Impedanzänderung für 10 min kontinuierlich aufgezeichnet. Als Stimuli wurden Plaquehomogenat (833 µg/ml), Kollagen (0,2-0,4 µg/ml; die Konzentration wurde für jeden Probanden individuell gewählt, sodass das Ausmaß der Aggregation ähnlich wie bei Plaquehomogenat war), TRAP (5 µM), PAR4-Agonist AY-NH₂ (0,1 mM), Arachidonsäure (0,6 mM), ADP (5 µM), Ristocetin (0,5 mg/ml) oder U46619 (300 nM) verwendet. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden als kumulative Aggregationswerte in willkürlichen Aggregationseinheiten (AU) über den Zeitraum von 10 min (AU*min) ausgedrückt.

4.2.5 Bestimmung der ATP-Sekretion im Blut

ATP-Sekretion wurde mittels Lumineszenz-Bestimmung unter Verwendung eines Lumi-Aggregometers®, wie früher beschrieben, gemessen^{161, 163}. Es wurden dieselben experimentellen Bedingungen wie für die MEA verwendet. NaCl (200 µl) und Hirudin-antikoaguliertes Blut (200 µl) wurden mit dem jeweiligen Inhibitor für 3 bzw. 15 min, wie oben beschrieben, bei 37°C ohne Rühren vorinkubiert. In manchen Ansätzen wurde Abciximab (20 µg/ml) allein oder in Kombination mit einem Tyrosinkinaseinhibitor zum Blockieren der Aggregation eingesetzt. Nach dem Vorinkubieren wurde das Luciferase-Luciferin Reagent (30 µl) in die Proben hinzugefügt, das Rühren (1000 rpm) gestartet und der jeweilige Stimulus zugesetzt. Als Stimuli dienten Plaquehomogenate (833 µg/ml), Kollagen (0,5 µg/ml) und TRAP (5 µM). Der maximale Anstieg der Lumineszenz nach 4 min wurde gemessen. Lumineszenzsignale wurden durch Zugabe von Lösungen definierter ATP-Konzentrationen ins Blut kalibriert.

4.2.6 Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Plaquehomogenat, Plaqueschnitte, fibrilläres und lösliches Kollagen wurden mit Hirudin-antikoagulierte Blut unter arteriellen Flussbedingungen beströmt.

4.2.6.1 Beschichtung von Deckgläschen mit atherosklerotischem Plaquematerial

Plauehomogenat wurde mit PBS im Verhältnis von 1:20 verdünnt und mittels Vortex gemischt. Das Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß mit Plaquesuspension (100 µl) wurde für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem sich die großen Plauepartikel abgesetzt hatten, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Davon wurden je 4 µl auf mit Isopropanol (70 %) gereinigte Deckgläschen aufgetragen und über eine Fläche von ca. 5 x 7 mm gleichmäßig ausgestrichen. Die beschichteten Deckgläschen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 4°C bis zum Experiment aufbewahrt. Die Vorbereitung und Aufbewahrung von atherosklerotischen Plaqueschnitten ist im Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

4.2.6.2 Beschichtung von Deckgläschen mit Kollagen

Zum Vergleich mit atherosklerotischem Plaquematerial wurde fibrilläres Horm®-Kollagen aus Bindegewebe verwendet, da dieses kommerzielle Kollagenpräparat Kollagen Typ I und III wie menschliche atherosklerotische Plaques enthält ^{8, 11, 50, 150, 159}. Horm®-Kollagen wurde mit SKF-Puffer verdünnt (20 µg/ml). Von der Verdünnung wurden je 3 µl auf zuvor mit Isopropanol (70 %) gereinigte Deckgläschen aufgetragen und über die Fläche von ca. 5 x 7 mm gleichmäßig verteilt. Die beschichteten Deckgläschen wurden bis zum Experiment in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Btk-Inhibition auf den $\alpha_2\beta_1$ -Signalweg wurde lösliches Kollagen verwendet. Es wurden je 3 µl löslichen Kollagens (fertige Lösung 100 µg/ml) auf zuvor mit Isopropanol (70 %) gereinigte Deckgläschen aufgetragen und über die Fläche von ca. 5 x 7 mm gleichmäßig verteilt. Die beschichteten Deckgläschen wurden direkt verwendet.

4.2.6.3 Durchführung der Flusseperimente

Für die Flusseperimente wurden die mit Plauehomogenat, Plaqueschnitten, fibrillärem Kollagen oder löslichem Kollagen beschichtete Deckgläschen auf die Flusskammern geklebt (0,1 Luer sticky slides, ibidi®), welche vorher mit humanem Serumalbumin (HSA, 4 % in PBS) zur Hemmung unspezifischer Thrombozytenadhäsion blockiert worden waren. Die Flusskammern wurden auf dem Objektisch eines Fluoreszenzmikroskops (TE2000-E, Nikon) fixiert, welches mit einer Inkubationskammer (37°C) ausgestattet war. Die Flusskammern wurden mit einer Spritzensaugpumpe über einen Plastikslauch verbunden. Zunächst wurden die Flusskammern mit PBS gespült und anschließend mit 4 % HSA in PBS für 2 min zur Hemmung unspezifischer Thrombozytenbindung blockiert. Danach wurden die Flusskammern

mit Hirudin-antikoaguliertem Blut unter arteriellen Flussbedingungen bei zwei verschiedenen Scherraten (600/s und 1500/s) durchströmt.

4.2.6.4 Berechnung der Flussgeschwindigkeiten

Um die gewünschten Scherraten (600/s oder 1500/s) in den Flussexperimenten zu erhalten, wurden die notwendigen Flussgeschwindigkeiten mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Flussgeschwindigkeit } (\mu\text{l/min}) = (\text{Scherrate } (\text{s}^{-1}) \times \text{Kammerhöhe } (\text{mm})^2 \times \text{Kammerweite } (\text{mm})) / 100^{164}$$

Die Kammerhöhe der 0,1 Luer sticky-Slides beträgt laut ibidi-GmbH 100 μm . Zudem muss die Höhe der Klebeschicht der sticky-Slides, die nach Herstellerangaben bei 50 μm liegt, mit in die Kammerhöhe einberechnet werden. Da die Deckgläschen sehr fest auf die sticky-Slides geklebt wurden, wurde die Kammerhöhe mikroskopisch ausgemessen und lag bei $109 \pm 2 \mu\text{m}$ ($n = 10$). Die Kammerweite betrug 5 mm. Diese Werte wurden für die Ermittlung der Flussgeschwindigkeiten verwendet.

4.2.6.5 Vorbereitung der Blutproben für die Flussexperimente

Für die 2 verschiedenen Scherraten von 600/s (entspricht der Flussgeschwindigkeit von 356 $\mu\text{l/min}$) und 1500/s (entspricht der Flussgeschwindigkeit von 891 $\mu\text{l/min}$) wurden 2 bzw. 3 ml Blut benötigt. Die Messzeit betrug 5-7 Minuten, um ein Plateau der maximalen Aggregation bzw. Adhäsion zu erreichen.

Die Konzentrationen von Syk Inhibitor II, PD173952 und R406 für die Flussexperimente wurden entsprechend den Dosis-Hemm-Kurven der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation in MEA gewählt. Syk Inhibitor II (Endkonzentration 2 μM , 5 μM oder 10 μM) wurde in verschiedenen Konzentrationen direkt in die Blutprobe pipettiert. PD173952 (Endkonzentration 2 μM , 5 μM oder 10 μM), R406 (Endkonzentrationen 5 μM , 10 μM und 15 μM) und DMSO (Endkonzentration im Blut 0,1 %; Kontrolle) wurden zur Verhinderung einer eventuellen Hämolyse zunächst zu 100 μl NaCl (0,9 %) zugegeben. Diese Mischung wurde dann in die Blutprobe pipettiert. Anschließend wurde Mepacrine (10 μM) oder DiOC6 (1 μM) zur Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten der Blutprobe zugesetzt. Die Proben wurden 5 min bei 37°C vorinkubiert. Als Kontrolle wurde NaCl (0,9 %) für Syk Inhibitor II und DMSO (Endkonzentration 0,1 %) für PD173952 und R406 verwendet.

Ibrutinib (Endkonzentrationen 0,2 μM , 0,5 μM und 1 μM), Acalabrutinib und ONO/GS-4059 (Endkonzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 2 μM bzw. 5 μM) wurden zunächst ins Falcon-Plastikröhrchen mit 100 μl NaCl (0,9 %) pipettiert. Dazu wurde anschließend humanes Blut (2-3 ml) zugegeben. Durch dieses Vorgehen wurde sichergestellt, dass die Btk-Inhibitoren vollständig in die Blutprobe gelangten. Die

Konzentrationen von Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 für die Flussexperimente wurden entsprechend den Dosis-Hemm-Kurven der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation in MEA gewählt. DiOC6 (1 μ M) wurde zur Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten ins Blut zugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 37°C vorinkubiert. Als Kontrolle wurde DMSO (Endkonzentration 0,1 %) oder NaCl (0,9 %) verwendet.

In den *ex vivo* Flussexperimenten wurde das Blut von Patienten unter bzw. ohne Ibrutinib-Therapie sowie von freiwilligen Spendern vor und nach der Ibrutinib-Einnahme sowie vor und nach der ASS-Einnahme mit DiOC6 (1 μ M) für 10 Minuten bei 37 °C vorinkubiert.

4.2.6.6 Analyse und Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion und –aggregation an atherosklerotisches Plaquematerial, fibrilläres oder lösliches Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen

Die Thrombozytenadhäsion und die Aggregatbildung (differenziert durch ihre unterschiedlichen Größen) wurden in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie (Exzitation: 485/25 nm, Emission: 528/38 nm) unter Verwendung eines 10x-Objektivs (numerische Apertur (NA) 0,4) mit einem Nikon TE2000E Mikroskop und einer CoolSNAP HQ2 CCD Kamera kontinuierlich (1 Bild/sek) für 5 bis 7 min aufgezeichnet. Die aufgenommenen Videos wurden mittels eines Softwarepakets NIS-Element 3.2 quantitativ analysiert, indem der mit Thrombozyten bedeckte Fluoreszenzflächenanteil (1,0 entsprach der Gesamtfläche) nach Subtraktion der Plaque-Autofluoreszenz zum Zeitpunkt 0 min und des Hintergrundes in jedem Bild ermittelt wurde¹⁵⁹. Der in dieser Einstellung visualisierte Bereich betrug 669 μ m \times 896 μ m. Am Ende entstand eine Flusskurve, in der die mit Thrombozyten bedeckte Bildfläche gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die in den Graphen angegebenen Werte entsprachen dem Mittelwert (MW) + Standardabweichung (SD) (gemessen jede sek) von n Experimenten für jeden Inhibitor mit Blut von verschiedenen Spendern.

4.2.7 Bestimmung der *in vitro* Verschlusszeit mit dem „platelet function analyzer“ PFA-100®

Das PFA-100®-Gerät ist eine Weiterentwicklung des Thrombostat-Systems, welches die primäre Hämostase simuliert und zur Messung der Blutungszeit *in vitro* verwendet wird^{165, 166}. Durch die Vorrichtung wird Citrat-antikoaguliertes Blut (0,8 ml je Probe) aus einem Behälter unter konstantem Vakuum durch eine Kapillare und ein kleines Loch in einem Membranfilter, der mit Kollagen/ADP oder Kollagen/Epinephrin beschichtet ist, angesaugt. Die Zeit, die für eine vollständige Okklusion der Apertur erforderlich ist, wird als "*in-vitro*-Verschlusszeit" ermittelt. Die Verschlusszeiten wurden bei fünf Patienten

mit oder ohne Ibrutinib-Behandlung gemessen. Die fünf Ibrutinib-Patienten waren die gleichen wie oben in den statischen und Flussexperimenten.

4.2.8 Statistik

Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) von n Experimenten angegeben. Dabei wurde stets Probenmaterial von jedem der n Spender unter allen Konditionen des Experiments getestet. Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das SigmaStat 3,5-Softwarepaket eingesetzt. Dieses analysiert zunächst mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnov-Tests, ob die Daten normal verteilt sind. Mittelwerte von 2 parallelen Versuchsbedingungen mit verbundenen Proben wurden nach Bestätigung der Normalität mit dem zweiseitigen gepaarten Student-t-Test (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) miteinander verglichen. Mehr als 2 parallel geführte experimentelle Bedingungen wurden durch ANOVA für verbundene Proben getestet. Die globale Signifikanz der ANOVA wurde in der Legende angegeben. Die interessierenden sekundären Paarvergleiche zweier experimenteller Konditionen wurden dann mittels der Bonferroni-Methode durchgeführt und mit Verbindungslinien und *-Symbolen gekennzeichnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Wenn eine Normalverteilung nicht gewährleistet war, wurden die entsprechenden nicht-parametrischen Tests, der Mann-Whitney U-Test für 2 Konditionen und für mehr als 2 Konditionen die Rangvarianzanalyse für verbundene Proben mit sekundärem Paarvergleich nach Tukey verwendet. Signifikanzniveaus wurden mit §-Symbolen analog gekennzeichnet. Dosis-Wirkungskurven mit einer Substanz wurden ebenfalls mit ANOVA für verbundene Proben analysiert und nur die sekundären Paarvergleiche zur Lösungsmittelkontrolle in den Abbildungen eingezeichnet. Bei den kontinuierlich aufgezeichneten Kinetiken (fluoreszenzmikroskopische Thrombozytenbedeckung von Plaque und Kollagen) wurden die Werte der parallel geführten verschiedenen experimentellen Konditionen jeweils zu den vollen Minuten ebenfalls mit ANOVA analysiert. In den Abbildungen wurden aus Platzgründen aber meist nur die sekundären Paarvergleiche bei 5 min (Plateauphase) eingezeichnet.

5. Ergebnisse

5.1 Wirkung von PD173952 auf die Thrombozytenfunktion *in vitro*

5.1.1 PD173952 hemmt die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte Plättchenaggregation im Vollblut unter statischen Bedingungen

Zur Stimulation der Thrombozytenaggregation im antikoagulierten Blut unter statischen Bedingungen wurden verschiedene Agonisten verwendet: Plaquehomogenat, fibrilläres Kollagen, TRAP, ADP und Arachidonsäure (AA). Plaque und fibrilläres Kollagen stimulieren die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen über GPVI-Aktivierung^{50, 159}. TRAP (über PAR-1), ADP (über die ADP-Rezeptoren P2Y₁₂ und P2Y₁) und Arachidonsäure (über die Bildung von TxA₂ und seine Bindung an den TPα-Rezeptor) vermitteln die Thrombozytenaggregation über GPCR-spezifische Signalwege und somit anders als Plaque und fibrilläres Kollagen (s. Kapitel 2.2.2).

Es wurde vermutet, dass durch die Hemmung der im proximalen GPVI-Signalweg agierenden Src-Familien-Kinasen und Syk die GPVI-vermittelte Thrombozytenaggregation nach Plaque- und Kollagen-Stimulation selektiv gehemmt werden kann. Zunächst wurde die Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 untersucht. Es zeigte sich eine vollständige Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch PD173952 ab der Konzentration von 5 µM (Abb. 2 A,B,D). Die Dosis-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation durch PD173952 waren mit IC₅₀-Werten von 1,72 ± 0,08 µM bzw. 2 ± 0,3 µM ähnlich (Abb. 2 A,B).

Plättchenaggregation nach Stimulation mit TRAP, welches den PAR-1-Rezeptor aktiviert, wurde durch PD173952 um bis zu 74 % reduziert (Abb. 2 C,D). Der IC₅₀-Wert für die Inhibition der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation betrug 1,7 ± 0,9 µM. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Hemmung der ADP-stimulierten Thrombozytenaggregation durch PD173952 (5 µM) (Abb. 2 D).

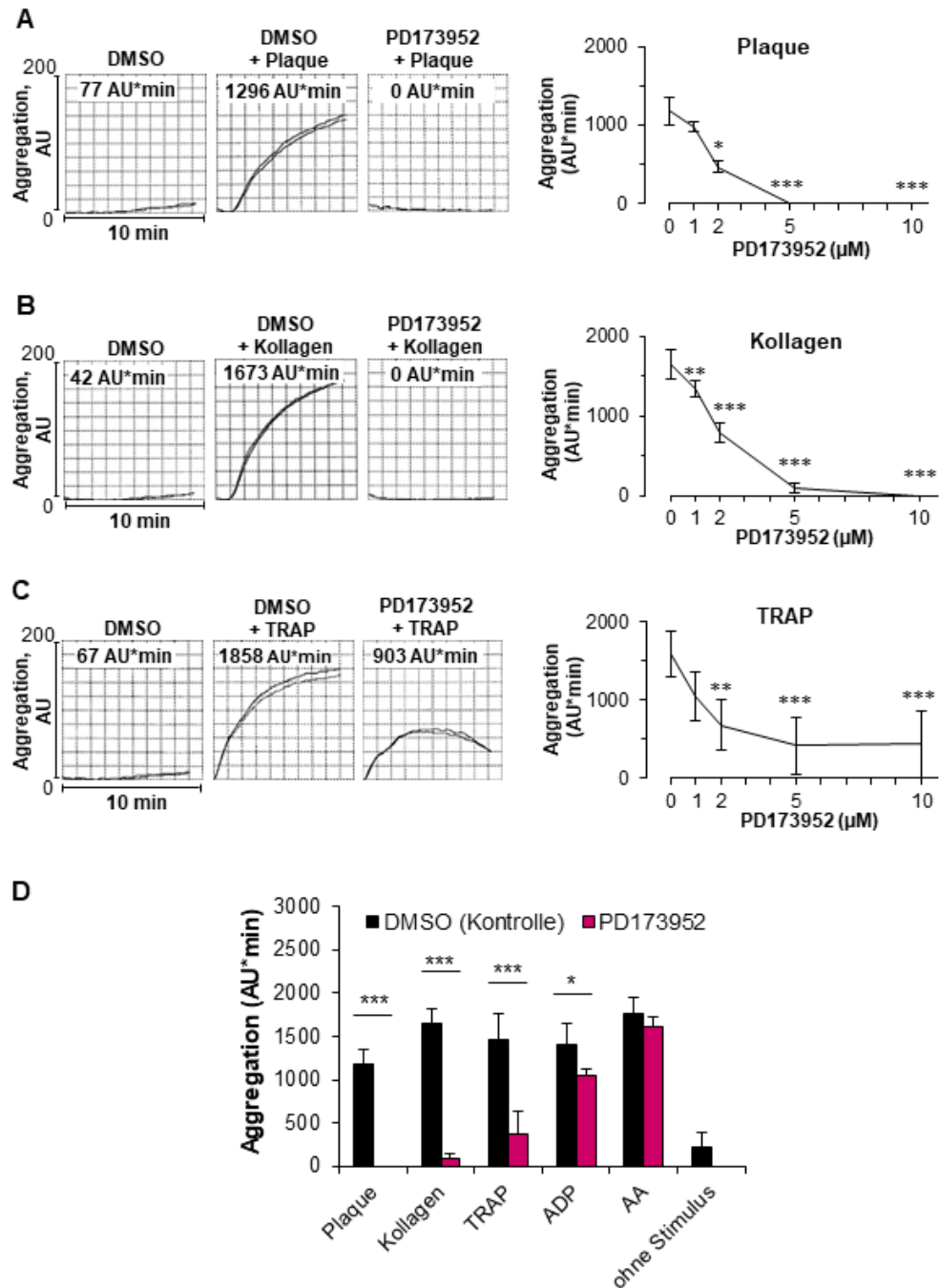


Abbildung 2: Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaque, Kollagen, TRAP, ADP und Arachidonsäure (AA).

Die Blutproben wurden für 3 min mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder PD173952 vorinkubiert, bevor eine Stimulation mit Plaque (833 µg/ml), Kollagen (0,5 µg/ml), TRAP (5 µM), ADP (5 µM) oder AA (0,6 mM) erfolgte. Links sind repräsentative MEA-Kurven der (A) Plaque-, (B) Kollagen- und (C) TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation (die Konzentration von PD173952 beträgt 10 µM). Die Zahlen in den Kurven stehen für kumulative Aggregationswerte (AU*min), welche 10 min nach Beginn der Stimulation gemessen wurden. Rechts sind Dosis-Wirkungs-Kurven von PD173952 für (A) Plaque, (B) Kollagen und (C) TRAP dargestellt. (D) Balkendiagramm zeigt die Effekte von PD173952 (5 µM) auf die Plaque-(833 µg/ml), Kollagen-(0,5 µg/ml), TRAP-(5 µM), ADP-(5 µM) und AA-(0,6 mM) induzierte Thrombozytenaggregation und spontane Thrombozytenaggregation ohne Stimulus. MW ± SD, n = 4-5. *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 für PD173952 vs. DMSO (Kontrolle). Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

5.1.2 PD173952 hemmt die Plaque- und Kollagen-stimulierte ATP-Sekretion

Um zu untersuchen, ob PD173952 die Thrombozytenaggregation indirekt über die Inhibierung der Sekretion hemmt, wurde die Stimulus-induzierte ATP-Sekretion aus den dichten Granula im Blut unter denselben experimentellen Bedingungen wie die Aggregation gemessen. Hierbei konnte die Plaque- und Kollagen-stimulierte ATP-Sekretion durch PD173952 (20 μ M) vollständig gehemmt werden (Abb. 3). Somit könnte die PD173952-vermittelte Hemmung der Plaque- und Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation zu einem gewissen Teil über die Inhibition der granulären Sekretion erfolgen.

PD173952 könnte zum Teil auch indirekt über die Hemmung der Aggregation die Sekretion hemmen. Um dies zu untersuchen, wurden die Thrombozyten mit Abciximab inkubiert, welches über die Hemmung der Fibrinogen-Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ die Aggregation verhindert. Durch Abciximab konnte die Plaque- und Kollagen-induzierte ATP-Sekretion um 53 ± 28 % bzw. um 38 ± 31 % reduziert werden (Abb. 3), was frühere Beobachtungen bestätigt, die gezeigt hatten, dass die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung während der Aggregation die Sekretion verstärkt¹⁶¹. Die vollständige Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Aggregation durch PD173952 ist daher durch eine direkte Hemmung sowohl der Aggregation als auch der Sekretion zu erklären.

Im Gegensatz zu einer vollständigen Hemmung der thrombozytären Sekretion nach Stimulation mit Plaque und Kollagen, wurde die TRAP-induzierte Sekretion durch PD173952 (20 μ M) nicht-signifikant um 28 ± 18 % gehemmt. Nach Zugabe von Abciximab konnte die Sekretion zum Teil gehemmt werden (um 29 ± 23 %), aber es konnte keine zusätzliche Inhibition der Sekretion durch gleichzeitige Gabe von PD173952 erreicht werden (Hemmung der Sekretion insgesamt um 35 ± 29 %) (Abb. 3, letzter Balken). Dies zeigt, dass PD173952 die Sekretion nach TRAP-Stimulation nicht direkt hemmt, sondern indirekt durch Hemmung des durch Src-Familien-Kinasen vermittelten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Signalwegs^{101, 168}.

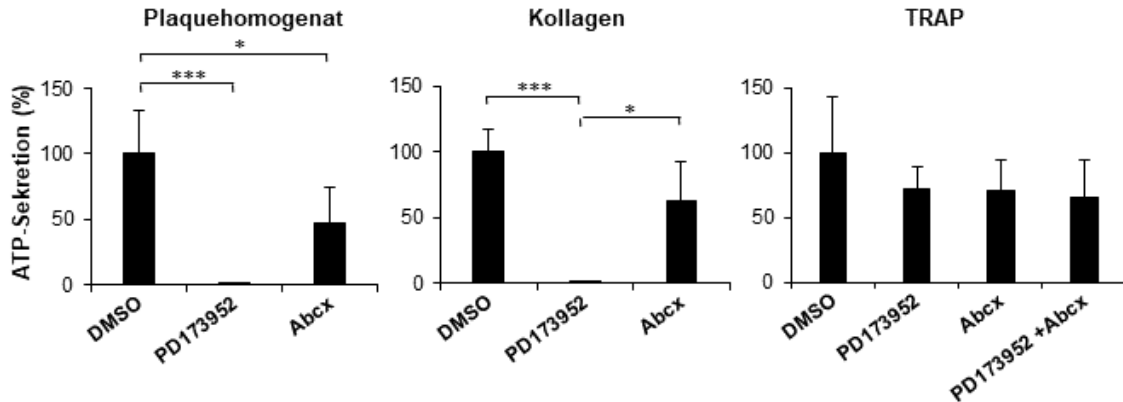


Abbildung 3: Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 auf die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte ATP-Sekretion im Blut.

Die Blutproben wurden für 3 min mit DMSO (0,1 %, Kontrolle), PD173952 (20 μ M), Abciximab (20 μ g/ml) allein oder in Kombination mit PD173952 vorinkubiert, bevor eine Stimulation mit Plaque (833 μ g/ml), Kollagen (0,5 μ g/ml) oder TRAP (5 μ M) erfolgte und der Rührvorgang gestartet wurde. Die ATP-Sekretion ist in % der DMSO-Kontrolle (100 %), gemessen 3 min nach Beginn der Stimulation, angegeben. MW + SD, n = 4-5. *: p < 0,05, ***: p < 0,001, wie durch horizontale Balken gekennzeichnet.

5.1.3 PD173952 hemmt die Plättchenthrombenbildung induziert auf Plaquehomogenat, Plaqueschnitten und Kollagen unter arteriellem Blutfluss

Um eine Thrombozytenaktivierung durch Plaqueruptur zu simulieren, wurden atherosklerotisches Plaquehomogenat und Plaqueschnitte unter arteriellen Flussbedingungen mit humanem Hirudin-antikoagulierten Blut bei einer Scherrate von 600/s beströmt. Zum Vergleich wurde fibrilläres Kollagen Typ I und Typ III verwendet, welches den Hauptbestandteil einer gesunden Arterienwand darstellt und die Thrombozytenadhäsion und Aggregation zusätzlich zu GPVI auch über die Aktivierung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt.

Bevor die Wirkung von PD173952 auf Plaquematerial und Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen untersucht wurde, wurde die Wirkung von DMSO, welches zum Auflösen von PD173952 verwendet wurde, auf die Stimulus-induzierte Thrombozytenaggregation getestet. DMSO (finale Konzentration 0,1 %) zeigte keinen Einfluss auf die Plättchenthrombenbildung (Abb. 4).

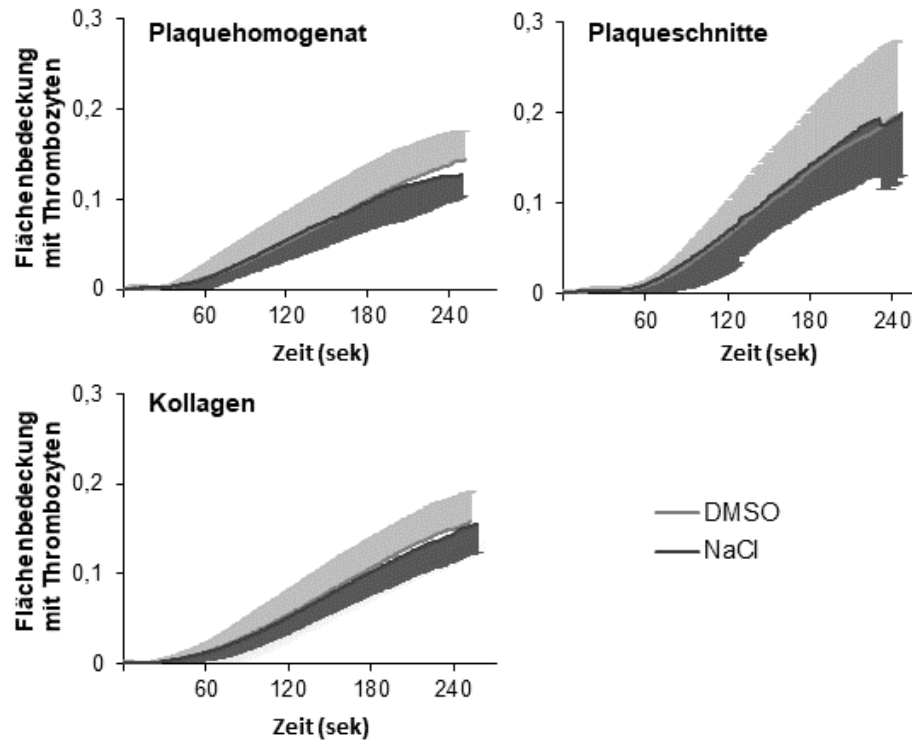


Abbildung 4: DMSO zeigt keinen Einfluss auf Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen.

Die Blutproben wurden mit NaCl oder DMSO (0,1 %) für 5 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss gestartet wurde. MW \pm SD, n = 5.

Die Kinetik und das Ausmaß der Plättchenthrombenbildung waren auf Plauehomogenat, Plaqueschnitten und Kollagen ähnlich (Abb. 5 A,B).

Durch PD173952 (10 μ M) konnte die Thrombenbildung auf Plauehomogenat vollständig gehemmt werden (Abb. 5 A,B). Hierbei persistierte die Thrombozytenadhäsion weiterhin, was in der Abbildung 5B rechts oben zu erkennen ist. PD173952 (10 μ M) hemmte die Plättchenthrombenbildung auf Plaqueschnitten zwar etwas weniger stark, jedoch auch deutlich – um 81 % (Abb. 5A,B). Auch die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung wurde durch PD173952 (10 μ M) signifikant um 50 ± 24 % reduziert (Abb. 5A,B). Geringere Konzentrationen von PD173952 (2 und 5 μ M) verzögerten und reduzierten die Thrombenbildung auf Plauehomogenat und Plaqueschnitten, ebenso wie auf Kollagen (Abb. 5B).

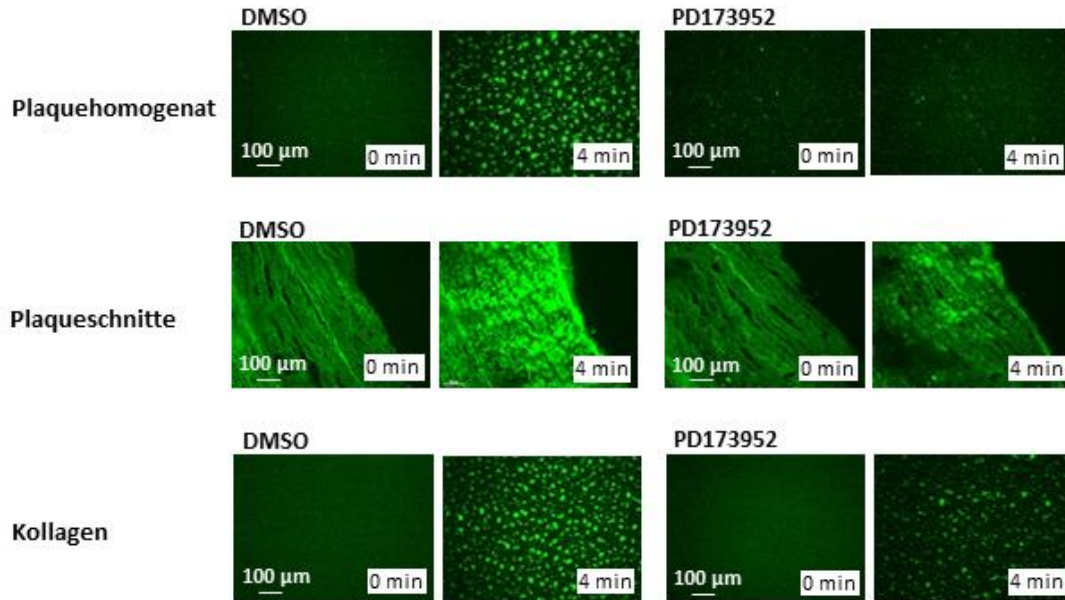


Abbildung 5A: Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung durch PD173952 unter arteriellen Flussbedingungen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

Die Blutproben wurden mit Mepacrine zur Thrombozytenmarkierung, und mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder PD173952 (10 μM) für 5 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet wurde. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen zeigen die Bedeckung von Plaquehomogenat, Plaqueschnitten und Kollagen mit Plättchentromben am Anfang und 4 min nach Beginn des Blutflusses sowie die Wirkung von PD173952. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

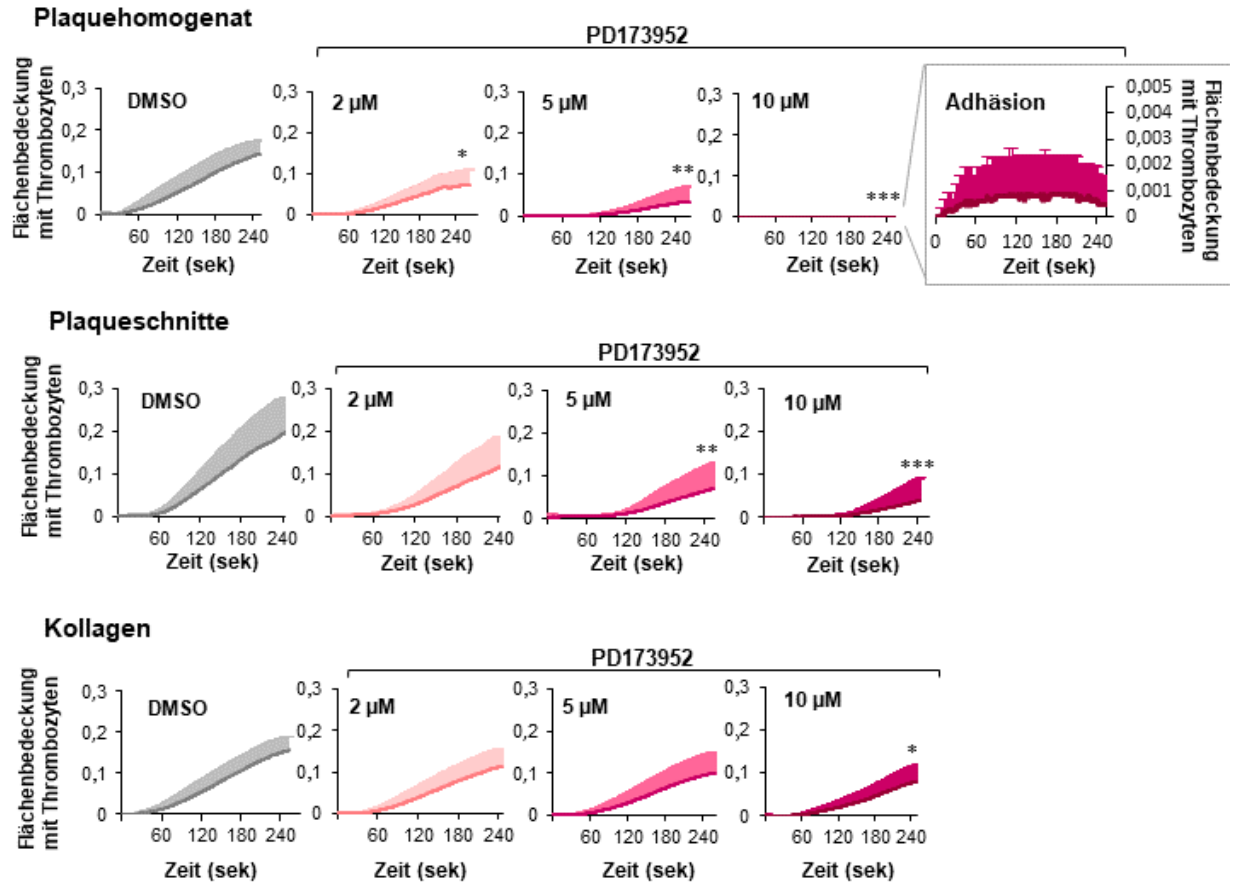


Abbildung 5B: Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung durch PD173952 unter arteriellen Flussbedingungen. Kinetik.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder PD173952 für 5 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet wurde. Die Liniendiagramme zeigen die Wirkung von PD173952 (2, 5 oder 10 µM) auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchentrombenbildung über die Zeit. Rechts oben ist die Kinetik der unter PD173952 (10 µM) persistierenden Thrombozytenadhäsion auf Plaquehomogenat bei ca. 100-fach kleinerer Skalierung der Y-Achse dargestellt. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 für PD173952 vs. DMSO (Kontrolle) bei 4 min. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Die Hemmung der durch Plaquehomogenat stimulierten Plättchentrombenbildung war im Vergleich zur Hemmung der Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung nur bei 10 µM PD173952 signifikant stärker (Abb. 6).

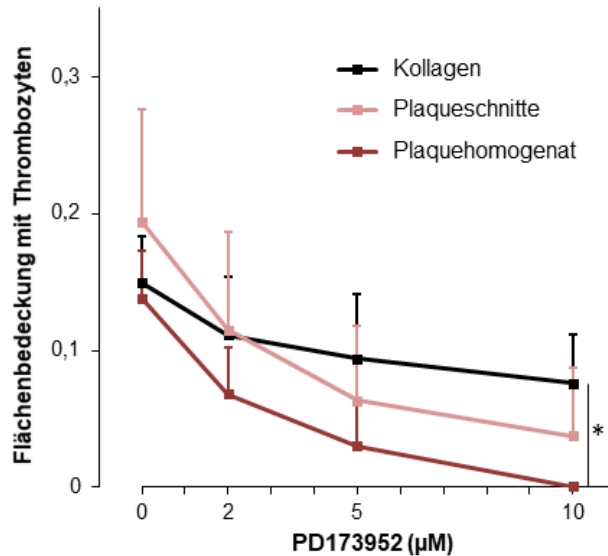


Abbildung 6: Dosis-Wirkungs-Kurven von PD173952 für die Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf Plaquematerial und Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen.

Siehe Legenden zu Abbildung 5A,B. Die Plättchenthrombenbildung wurde 4 min nach Flussbeginn (Scherrate 600/s) gemessen. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05.

5.2 Wirkung von Syk Inhibitoren (Syk Inhibitor II, R406) auf die Thrombozytenfunktion *in vitro*

5.2.1 Syk Inhibitor II hemmt die durch Plaque und Kollagen, aber nicht die durch TRAP und ADP stimulierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen

Die Wirkung von Syk Inhibitor II auf die GPVI-abhängige, durch Plaquehomogenat und Kollagen stimulierte Aggregation, und die GPCR-vermittelte Aggregation nach Stimulation mit TRAP, ADP, Arachidonsäure (AA) und dem TxA₂-Rezeptor-Agonisten U46619 wurde mittels MEA im antikoagulierten Blut untersucht. Hierbei wurde die Plaque-stimulierte Thrombozytenaggregation durch Syk Inhibitor II (5 µM) vollständig gehemmt. Die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation wurde ebenfalls deutlich (um 85 %) reduziert. Die IC₅₀-Werte für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch Syk Inhibitor II waren ähnlich und lagen bei 1,78 ± 0,8 µM bzw. bei 2,04 ± 0,6 µM (Abb. 7A,B). Im Gegensatz dazu wurde die TRAP-stimulierte Thrombozytenaggregation durch Syk Inhibitor II (10 µM) maximal nur um 46 ± 28 % reduziert (Abb. 7C). Ferner wurde Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP, Arachidonsäure (AA) und dem TxA₂-Rezeptor-Agonisten U46619 durch Syk Inhibitor II (5 µM) nur minimal bzw. nicht gehemmt (Abb. 7D).

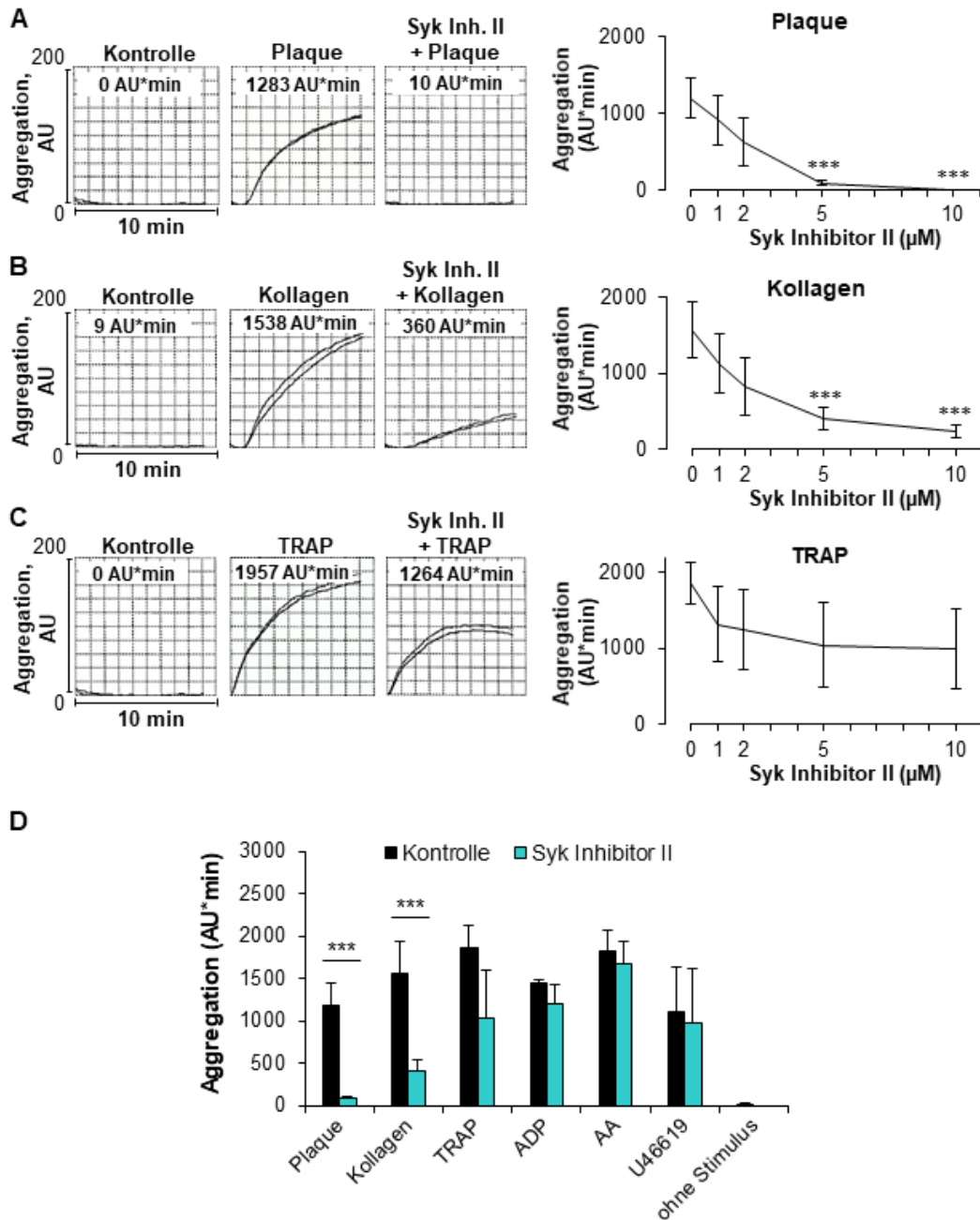


Abbildung 7: Wirkung des Syk Inhibitor II auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaque, Kollagen, TRAP, ADP, Arachidonsäure (AA) und U46619 (TxA₂-Rezeptor-Agonist).

Die Blutproben wurden mit NaCl (0,9 %, Kontrolle) oder Syk Inhibitor II für 3 min bei 37°C vorinkubiert, bevor eine Stimulation mit (A) Plaquehomogenat (833 µg/ml), (B) Kollagen (0,5 µg/ml) oder (C) TRAP (5 µM) erfolgte. Links sind repräsentative MEA-Kurven der Stimulus-induzierten Thrombozytenaggregation (die Konzentration von Syk Inhibitor II beträgt 5 µM) zu sehen; Messzeit 10 min. Die Zahlen in den Kurven stehen für kumulative Aggregationswerte (AU*min), welche 10 min nach Beginn der Stimulation gemessen wurden. Rechts sind Dosis-Wirkungs-Kurven von Syk Inhibitor II. (D) Balkendiagramm zeigt die Effekte von Syk Inhibitor II (5 µM) auf die Plaque-(833 µg/ml), Kollagen-(0,5 µg/ml), TRAP-(5 µM), ADP-(5 µM), AA-(0,6 mM) und U46619-(300 nM) induzierte Thrombozytenaggregation und die spontane Thrombozytenaggregation (ohne Stimulus). MW ± SD, n = 4-5, ***: p < 0,001 für Kontrolle vs. Syk Inhibitor II.

5.2.2 Syk Inhibitor II hemmt vollständig die durch Plaque und Kollagen, aber nicht die durch TRAP stimulierte thrombozytäre ATP-Sekretion

Um zu untersuchen, ob Syk inhibitor II die Thrombozytenaggregation indirekt über die Hemmung der Sekretion blockiert, wurde die Stimulus-induzierte ATP-Sekretion aus den dichten Granula unter denselben experimentellen Bedingungen wie die Aggregation gemessen. Hierbei konnte die Plaque- und Kollagen-stimulierte ATP-Sekretion, ähnlich wie die Aggregation, fast komplett (um mehr als 95 %) durch Syk Inhibitor II gehemmt werden (Abb. 8). In Abwesenheit der Aggregation nach Zugabe von Abciximab wurde die ATP-Sekretion nach Plaquehomogenat- und Kollagen-Stimulation etwas stärker als in den früheren Experimenten (Abb. 3) gehemmt. Die zusätzliche Gabe des Syk Inhibitor II führte zu einer beinahe vollständigen Inhibition der Plaque- und Kollagen-induzierten ATP-Sekretion. Somit hemmt der Syk Inhibitor II direkt und unabhängig von der Aggregation die Plaque- und Kollagen-induzierte Sekretion von Inhaltsstoffen der dichten Granula und reduziert möglicherweise zum Teil die Aggregation durch Hemmung der thrombozytären Sekretion.

Im Gegensatz zur der annähernd vollständigen Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten ATP-Sekretion, konnte die TRAP-stimulierte Sekretion durch den Syk Inhibitor II nur um 17 ± 15 % reduziert werden (Abb. 8). In Anwesenheit von Abciximab, welches die TRAP-stimulierte Sekretion wieder reduzierte (um 37 ± 8 %; siehe auch Abb. 3), zeigte der Syk Inhibitor II keine zusätzliche Hemmung der ATP-Sekretion. Dies zeigt, dass der Syk Inhibitor II die Sekretion nach TRAP-Stimulation nicht hemmt, und die Thrombozytenaggregation unabhängig von der Wirkung auf die Sekretion reduziert.

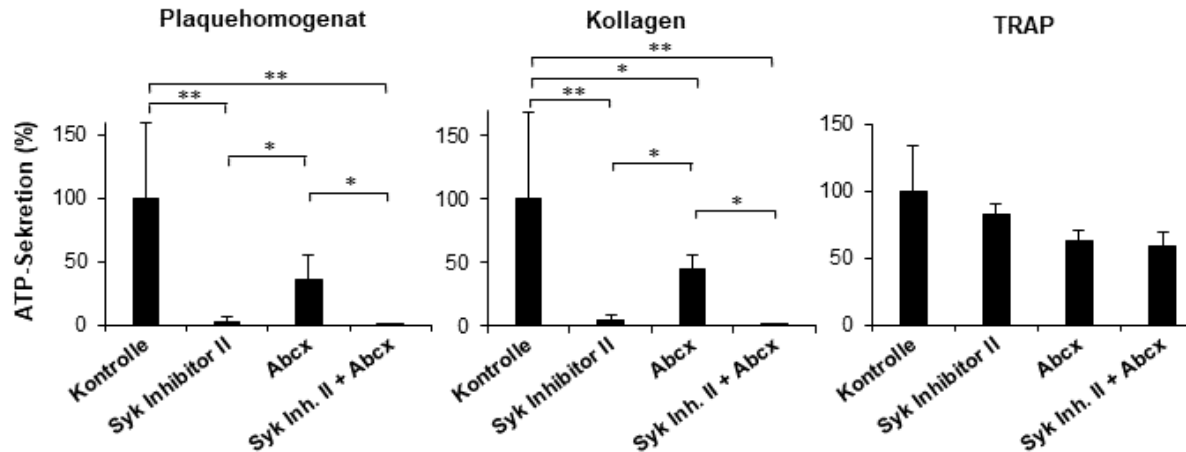


Abbildung 8: Wirkung des Syk Inhibitor II auf die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte ATP-Sekretion im Blut.

Die Blutproben wurden mit NaCl (0,9 %, Kontrolle), Syk Inhibitor II (20 μ M), Abciximab (20 μ g/ml) alleine oder mit Syk Inhibitor II für 3 min bei 37°C vorinkubiert, bevor eine Stimulation mit Plaquehomogenat (833 μ g/ml), Kollagen (0,5 μ g/ml) oder TRAP (5 μ M) erfolgte. Für weitere Einzelheiten s. Abbildung 3. MW + SD, n = 4-5, *: p < 0,05; **: p < 0,01, wie durch horizontale Balken gekennzeichnet.

5.2.3 Geringe Konzentrationen von Syk inhibitor II hemmen selektiv die Plaque-, aber nicht die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flußbedingungen

Als Nächstes wurde die Wirkung von Syk Inhibitor II auf die Plaquehomogenat-, Plaqueschnitte- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen untersucht. Die durch Plaquehomogenat stimulierte Plättchenthrombenbildung wurde durch Syk Inhibitor II in niedriger Konzentration (2 μ M) vollständig gehemmt (Abb. 9A). Die Videos verdeutlichen die Wirkung des Syk Inhibitor II auf die durch Plaquehomogenat stimulierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s). Im Vergleich zur Kontrolle (Video 1) hemmt der Syk Inhibitor II (2 μ M; Video 2) die Bildung der Plättchenthromben komplett, während eine Thrombozytenadhäsion an Plaquehomogenat weiterhin zu beobachten ist. Dabei haften manche Thrombozyten nur transient an Plaquehomogenat, während andere stabil adhären. Die Thrombozytenadhäsion in Gegenwart von Syk Inhibitor II war auch quantifizierbar (siehe Abb. 9A rechts oben). Syk Inhibitor II (2 μ M) hemmte ebenfalls stark die Thrombenbildung auf Plaqueschnitten (um 84 ± 16 %) (Abb. 9B), jedoch nicht auf Kollagenfasern (Abb. 9C).

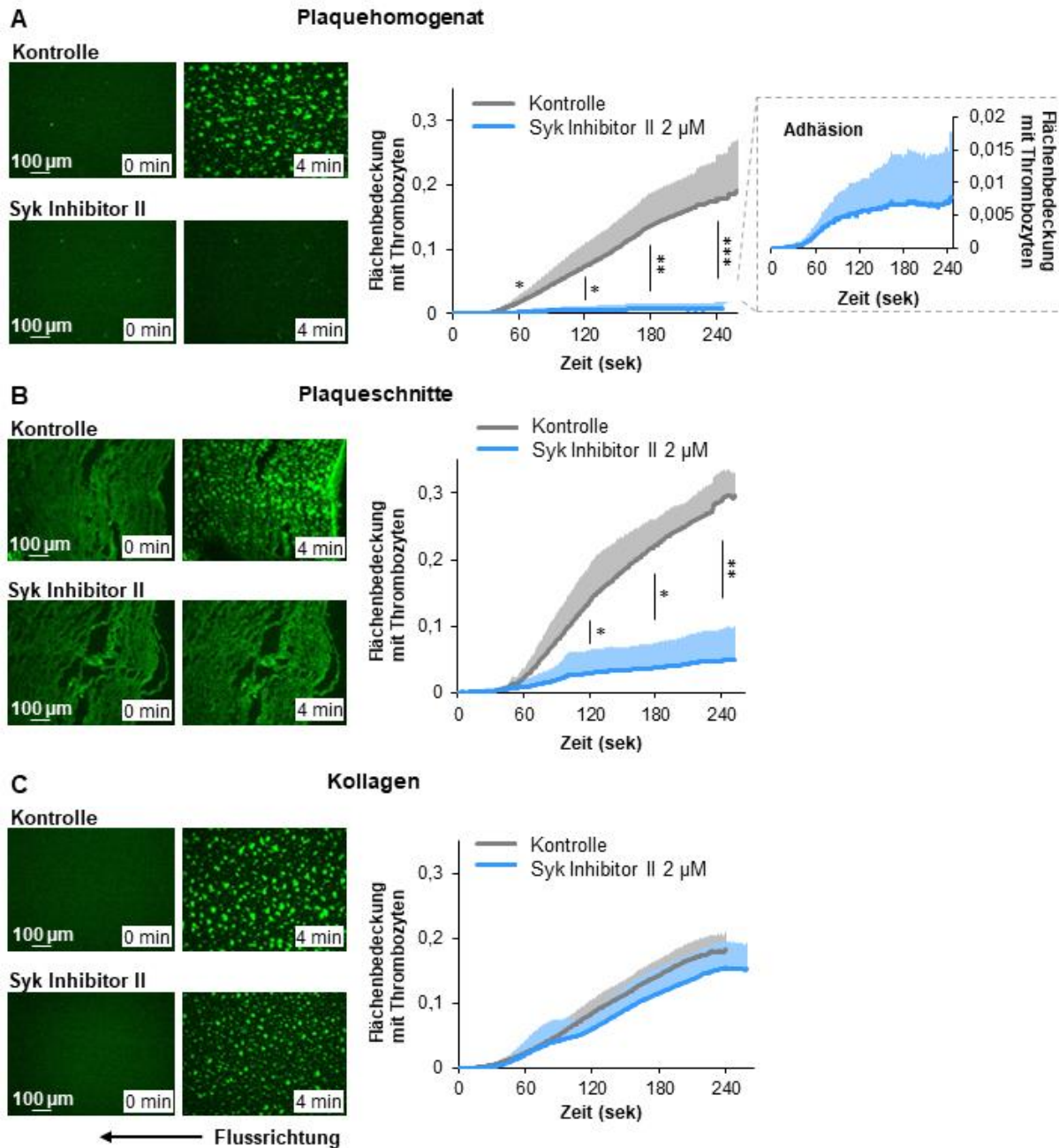


Abbildung 9 Selektive Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-induzierten Plättenthrombenbildung durch Syk Inhibitor II unter arteriellen Flussbedingungen. Die Blutproben wurden mit Mepacrine zur Thrombozytenanfärbung, ohne (Kontrolle) oder mit Syk Inhibitor II (2 μ M in NaCl) für 5 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet wurde. Links zeigen repräsentative mikroskopische Aufnahmen die Plättenthrombenbildung auf Plaquehomogenat (A), Plaqueschnitten (B) und Kollagen (C) bei Flussbeginn und 4 min danach sowie die Wirkung des Syk Inhibitor II. Rechts sind Liniendiagramme abgebildet, welche die Wirkung von Syk Inhibitor II (2 μ M) auf die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättenthrombenbildung zeigen. Siehe auch Videos 1-2. Rechts oben ist dargestellt, dass eine Thrombozytenadhäsion in Anwesenheit von Syk Inhibitor II noch messbar ist (die Y-Skala ist vergrößert). Für weitere Einzelheiten s. Abbildung 5A,B. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05; **: p < 0,01, ***: p < 0,001 für Syk Inhibitor II vs. NaCl (Kontrolle) bei voller Minutenzahl.

Bei höheren Konzentrationen von Syk Inhibitor II (5 und 10 μM) wurde die Thrombozytenadhäsion auf Plaquehomogenat stärker gehemmt (Abb. 10, oben rechts). Die Plättchenthrombenbildung auf Plaqueschnitten wurde durch höhere Konzentrationen von Syk inhibitor II ebenfalls zunehmend stärker reduziert (Abb. 10, Mitte). Unter Syk Inhibitor II 10 μM war die Plättchenthrombenbildung auf Plaqueschnitten vollständig gehemmt, jedoch die Thrombozytenadhäsion war noch vorhanden und messbar (Abb. 10, Mitte rechts). In höheren Konzentrationen hemmte Syk Inhibitor II die Plättchenthrombusbildung auch auf Kollagenfasern (Abb. 10, unten).

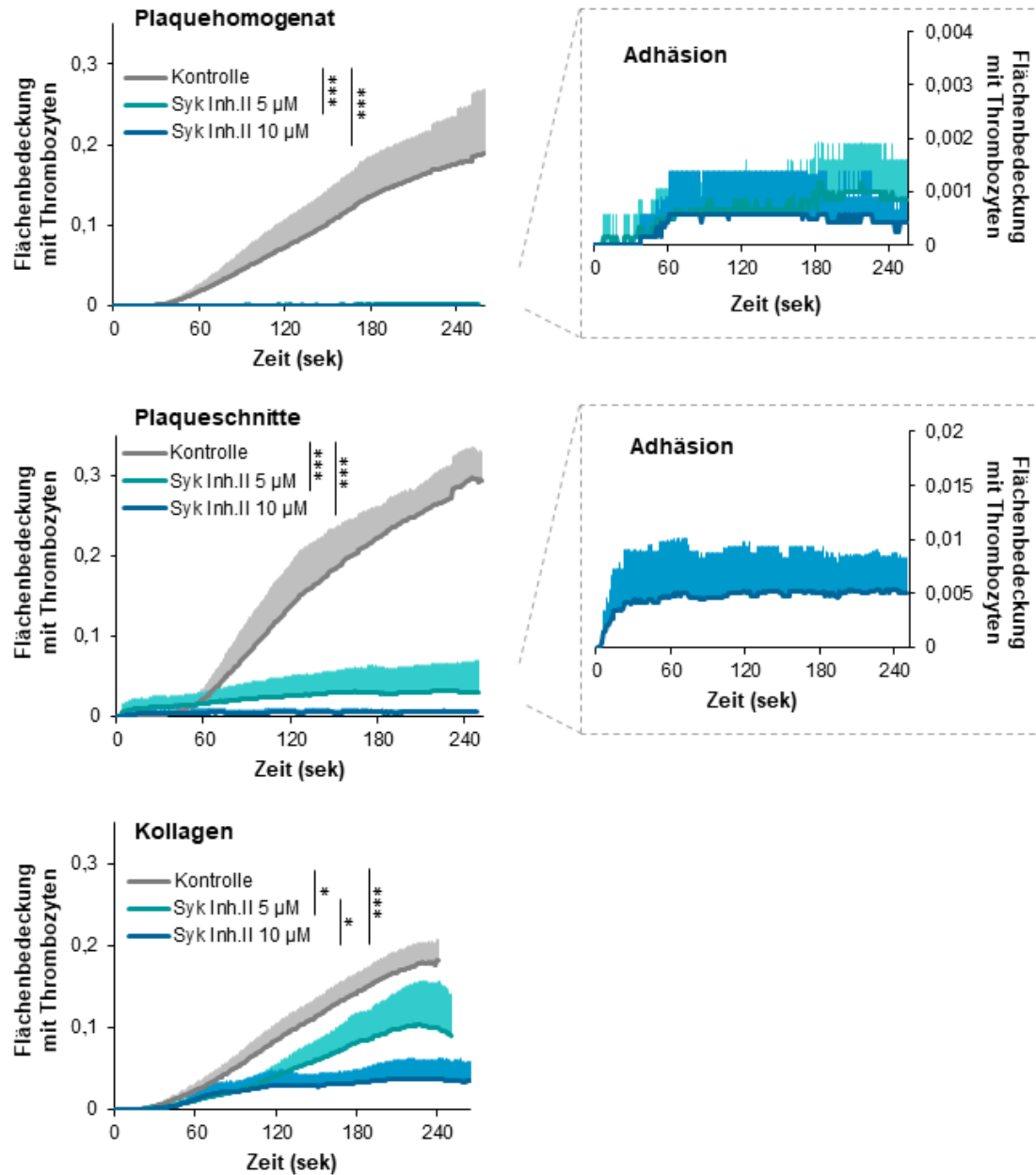


Abbildung 10: Wirkung des Syk Inhibitor II (5 µM und 10 µM) auf die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s). Hemmung der Thrombozytenaggregation auf Plaquehomogenat, Plaqueschnitten und Kollagen durch Syk Inhibitor II ist links zu sehen. Rechts ist dargestellt, dass in Gegenwart von Syk Inhibitor II eine Thrombozytenadhäsion noch messbar ist (die Y-Skala ist vergrößert). Für weitere Einzelheiten s. Abbildung 9. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05; ***: p < 0,001 nach 4 min Blutfluss.

Somit konnte Syk Inhibitor II bei allen untersuchten Konzentrationen (2 µM, 5 µM und 10 µM) die Plättchentrombenbildung auf Plaquematerial signifikant besser hemmen als die Plättchentrombenbildung auf Kollagenfasern (Abb. 11).

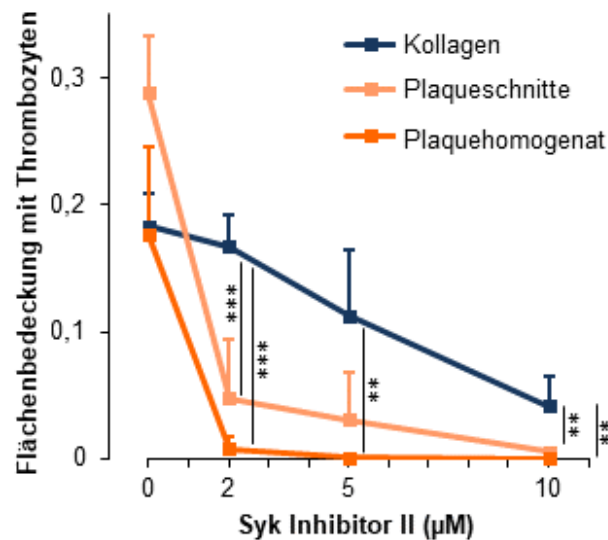


Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurven von Syk Inhibitor II für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen.

Die Blutproben wurden ohne (Kontrolle) oder mit Syk Inhibitor II (2 µM, 5 µM oder 10 µM) für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Die Flächenbedeckung mit Thrombozyten wurde 4 min nach Flussbeginn (Scherrate von 600/s) gemessen. Weitere Einzelheiten entsprechen der Legende von der Abbildung 9. MW + SD, n = 5, **: p < 0,01, ***: p < 0,001.

5.2.4 R406 unterdrückt vorzugsweise die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation in Blut unter statischen Bedingungen

Im nächsten Schritt wurde ein weiterer Syk-Inhibitor R406 untersucht, welcher Syk reversibel hemmt und dessen orales Prodrug Fostamatinib (R788) aus klinischen Studien u.a. zur Behandlung von rheumatoider Arthritis bekannt ist (s. Kapitel 2.7.2). R406 zeigte eine dosis-abhängige Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation mit einem IC_{50} -Wert von 6,05 µM (Abb. 12A). Die Plaque- und Kollagen-stimulierte Thrombozytenaggregation wurde durch 15 µM R406 annähernd vollständig gehemmt. Auch die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit TRAP und ADP wurde signifikant um 56 % bzw. 43 % reduziert (Abb. 12B).

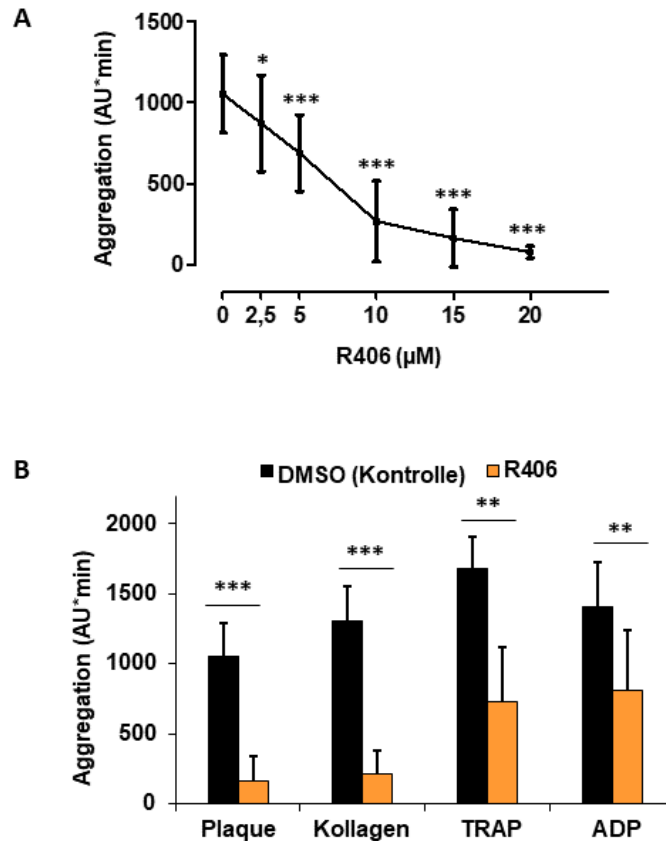


Abbildung 12: Wirkung des Syk Inhibitor R406 auf die Plaque-, Kollagen-, TRAP- und ADP-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen.

(A) Dosis-Wirkungs-Kurve von R406 für die Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation. Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %; Kontrolle) oder mit R406 in verschiedenen Konzentrationen (2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM oder 20 µM) für 3 min bei 37°C vorinkubiert, bevor eine Stimulation mit Plaquehomogenat (833 µg/ml) erfolgte. MW ± SD, n = 6. **(B)** R406 (15 µM) hemmt die Plaque- und Kollagen (0,5 µg/ml)-induzierte Thrombozytenaggregation stärker als Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit TRAP (5 µM) und ADP (5 µM). MW + SD, n = 4-6, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 für R406 vs. Kontrolle.

5.2.5 Wirkung von R406 auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen

Als Nächstes wurde R406 (5, 10 und 15 µM) unter arteriellen Flussbedingungen untersucht. Hierbei wurde die Thrombozytenaggregation auf Plaquehomogenat durch R406 dosis-abhängig reduziert, wobei eine signifikante Hemmung der Plaque-induzierten Thrombenbildung durch 10 µM R406 erreicht wurde (Abb. 13). Im Gegensatz dazu wurde die Kollagen-stimulierte Thrombenbildung durch R406 in allen getesteten Konzentrationen (5, 10 und 15 µM) nicht gehemmt (Abb. 13).

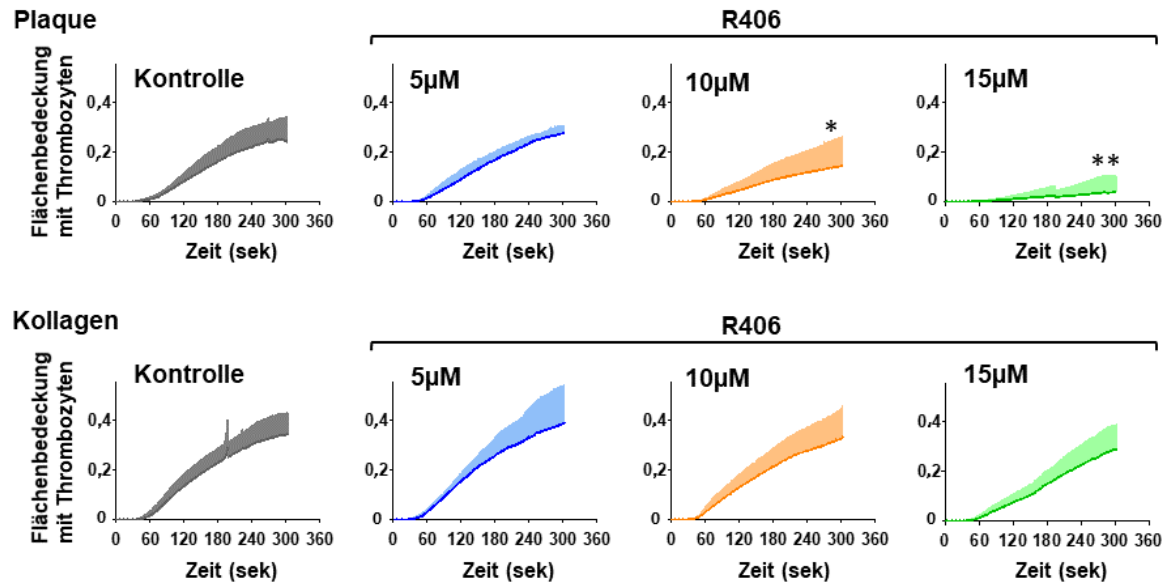


Abbildung 13: Selektive Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung durch Syk Inhibitor R406 unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s).

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %; Kontrolle) oder mit R406 in verschiedenen Konzentrationen (5 µM, 10 µM oder 15 µM) für 10 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet wurde. MW + SD, n = 4, *: p<0,05, **: p<0,01 für R406 vs. Kontrolle.

5.3 Wirkung von Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059) auf die Thrombozytenfunktion *in vitro* und *ex vivo*

Zur selektiven Hemmung der Thrombozytenaktivierung wurde nach einem oral verfügbaren irreversiblen Tyrosinkinasehemmer gesucht, der in niedriger Dosis die Blutplättchen für ihre gesamte Lebensdauer hemmen würde. Thrombozyten haben keinen Zellkern und können Enzyme daher nicht synthetisieren. Andere Körperzellen mit Zellkern dagegen würden die Tyrosinkinasen kontinuierlich nachbilden. So könnte eine Thrombozyten-spezifische Wirkung und Minimierung von möglichen Nebenwirkungen von Tyrosinkinaseinhibitoren erreicht werden. Als erster solcher irreversibler Tyrosinkinasehemmer wurde in dieser Arbeit der Btk-Inhibitor Ibrutinib untersucht. Btk spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der PLCγ2 im distalen GPVI-signaling (s. Kapitel 2.6.1)^{21, 77}. Ibrutinib ist derzeit zur Therapie von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), kleinzelligem B-Zell-Lymphom, Mantelzelllymphom (MCL), und Morbus Waldenström sowie seit vor kurzem zur Therapie von *Graft-versus-Host*-Reaktion zugelassen¹²⁶⁻¹²⁹. In klinischen Studien wurde ein erhöhtes Blutungsrisiko unter Ibrutinib-Therapie beobachtet¹³⁶⁻¹³⁹, während unter neueren selektiveren Btk-Inhibitoren der zweiten Generation Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-

4059 weniger Blutungskomplikationen als unter Ibrutinib-Therapie beschrieben wurden¹³¹. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Ibrutinib und dieser neuen selektiveren Btk-Inhibitoren Acalabrutinib und ONO/GS-4059 auf die Thrombozytenaggregation durch verschiedene Stimuli in unterschiedlichen Ansätzen untersucht.

5.3.1 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut unter statischen Bedingungen

Die Wirkung von Btk-Inhibitoren auf die Plättchenaggregation nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten wurde unter statischen Bedingungen mittels MEA untersucht. Die Btk-Inhibitoren wurden für 15 min mit Blut prä-inkubiert, um die Entfaltung ihrer irreversiblen Wirkung auf die Btk zu ermöglichen¹²⁵. Ibrutinib (1 μM) blockierte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaquehomogenat oder Kollagen annähernd vollständig (um > 90 % im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 14). Hierbei zeigte Ibrutinib ähnliche Dosis-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-stimulierten Aggregation mit einem IC_{50} -Wert von $0,18 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Abb. 14, links) bzw. $0,12 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (nicht dargestellt). Die maximale Hemmung der Thrombozytenaggregation wurde bei einer Ibrutinib-Konzentration von 0,5 μM erreicht (Abb. 14, links).

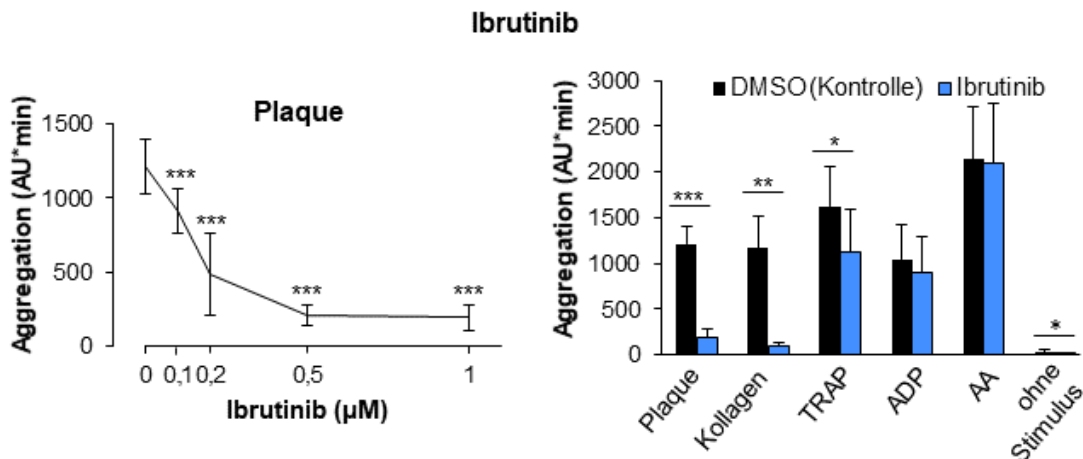


Abbildung 14: Wirkung von Ibrutinib auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Plaquehomogenat, Kollagen, TRAP, ADP und AA.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder Ibrutinib für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit jeweiligem o.g. Agonisten für 10 min gemessen. Links ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von Ibrutinib für die Plaque (833 $\mu\text{g/ml}$)-induzierte Thrombozytenaggregation zu sehen. Rechts sind die Wirkungen von Ibrutinib (1 μM) auf die mit Plaque (833 $\mu\text{g/ml}$), Kollagen (0,1-0,3 $\mu\text{g/ml}$), TRAP (5 μM), ADP (5 μM) oder AA (0,6 mM) stimulierte Aggregation sowie spontane Aggregation (ohne Stimulus) in einem Bardiagramm dargestellt. Die Kollagenkonzentrationen wurden in jedem Experiment titriert, um eine der Plaque-stimulierten Aggregation vergleichbare Aggregation zu induzieren. MW \pm SD, n = 5, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 für DMSO (Kontrolle) vs. Ibrutinib. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Die Inhibition der Plaque- und Kollagen-vermittelten Plättchenaggregation durch Ibrutinib wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 min aufrechterhalten (Abb. 15).

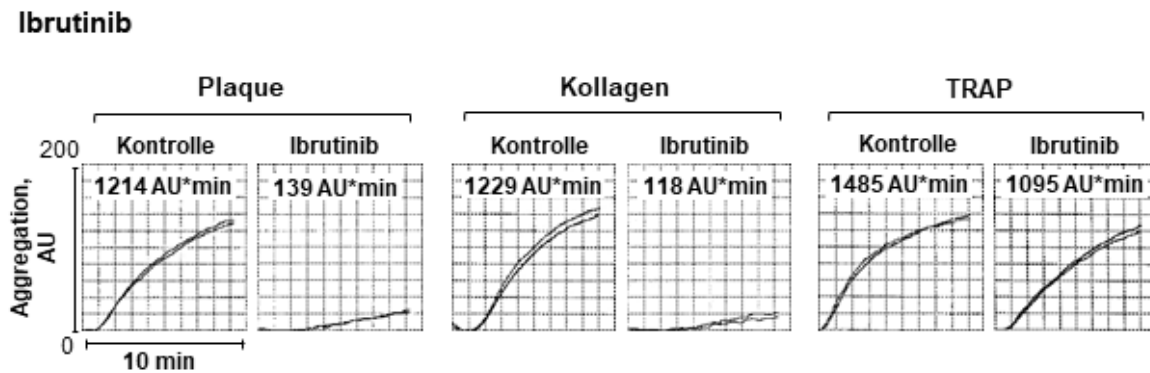


Abbildung 15: MEA-Kurven der Plaque-, Kollagen- und TRAP-stimulierten Thrombozytenaggregation im Blut. Wirkung von Ibrutinib.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle) oder Ibrutinib (1 mM) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Plaque (833 µg/ml), Kollagen (0,3 µg/ml) oder TRAP (5 µM) für 10 min erfolgte. Repräsentative MEA-Kurven sind dargestellt. Die Zahlen in den Kurven stehen für kumulative Aggregationswerte (AU*min), welche 10 min nach Beginn der Stimulation gemessen wurden. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Es wurde beschrieben, dass Btk nicht nur im GPVI-Signalweg, sondern auch bei der vWF/GPIb-stimulierten Signaltransduktion in Thrombozyten beteiligt ist⁸⁸. Es wurde daher die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation, welche von der vWF-Bindung an thrombozytäres GPIb abhängig ist, gemessen. Ibrutinib hemmte die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation. Der IC₅₀-Wert lag bei $0,085 \pm 0,017$ µM. Die maximale Hemmung der Ristocetin-stimulierten Plättchenaggregation konnte bei der Ibrutinib-Konzentration von 0,5 µM erreicht werden (Abb. 16).

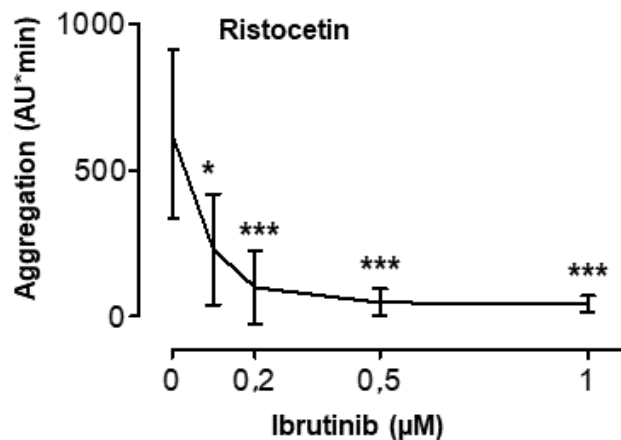


Abbildung 16: Wirkung von Ibrutinib auf die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Ristocetin.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle) oder Ibrutinib für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Ristocetin (0,5 mg/ml) für 10 min erfolgte. MW \pm SD, n = 4, *: p < 0,05, ***: p < 0,001 für DMSO (Kontrolle) vs. Ibrutinib. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Im Gegensatz zu einer deutlichen, annähernd vollständigen Hemmung der Plaque-, Kollagen- und Ristocetin-stimulierten Thrombozytenaggregation konnte die TRAP-induzierte Aggregation durch Ibrutinib nur um 31 % reduziert werden (Abb. 14, rechts). Noch geringer fiel die hemmende Wirkung von Ibrutinib auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP (-13 %) und Arachidonsäure (AA) (-1,5 %) aus (Abb. 14, rechts).

Ebenso wurde die durch einen PAR-4-Rezeptor-Agonisten induzierte Plättchenaggregation durch Ibrutinib nur gering (-15 %) reduziert (Abb. 17).

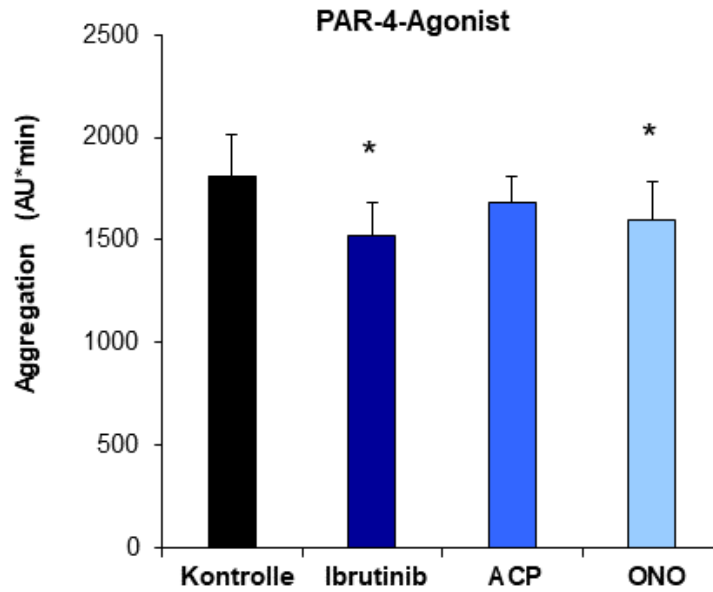


Abbildung 17: Wirkung von Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit dem PAR-4-Rezeptor-Agonisten AY-NH2.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle), Ibrutinib (1 μ M), Acalabrutinib (2 μ M) oder ONO/GS-4059 (2 μ M) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit AY-NH2 (100 μ M) für 10 min erfolgte. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05, für DMSO (Kontrolle) vs. Btk-Inhibitoren. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Zum Vergleich mit Ibrutinib wurden die neuen selektiveren Btk-Inhibitoren der zweiten Generation Acalabrutinib (APC-196) und ONO/GS-4059, die in klinischen Studien im Vergleich zu Ibrutinib mit weniger Blutungskomplikationen assoziiert waren^{131, 169, 170}, untersucht. Zunächst wurde die Wirkung von Acalabrutinib und ONO/GS-4059 auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten unter statischen Bedingungen getestet. Ähnlich wie Ibrutinib, reduzierten auch Acalabrutinib und ONO/GS-4059 die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation maximal um 87 % bzw. 83 %, aber mit höheren IC₅₀-Werten (0,34 ± 0,19 μ M bzw. 0,79 ± 0,33 μ M) als Ibrutinib (Abb. 18, links). Diese Btk-Inhibitoren der zweiten Generation zeigten auch eine deutliche Hemmung der Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation (um 89 % bzw. um 85 %; Abb. 18, rechts). Ähnlich wie Ibrutinib reduzierten die neuen Btk-Inhibitoren die TRAP-induzierte Plättchenaggregation um 30 % bzw. 27 % (Abb. 18, rechts). Die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP, AA oder dem PAR-4-Agonisten AY-NH2 wurde durch die neuen Btk-Inhibitoren ähnlich wie durch Ibrutinib gering bzw. gar nicht gehemmt (Abb. 18, rechts und 17).

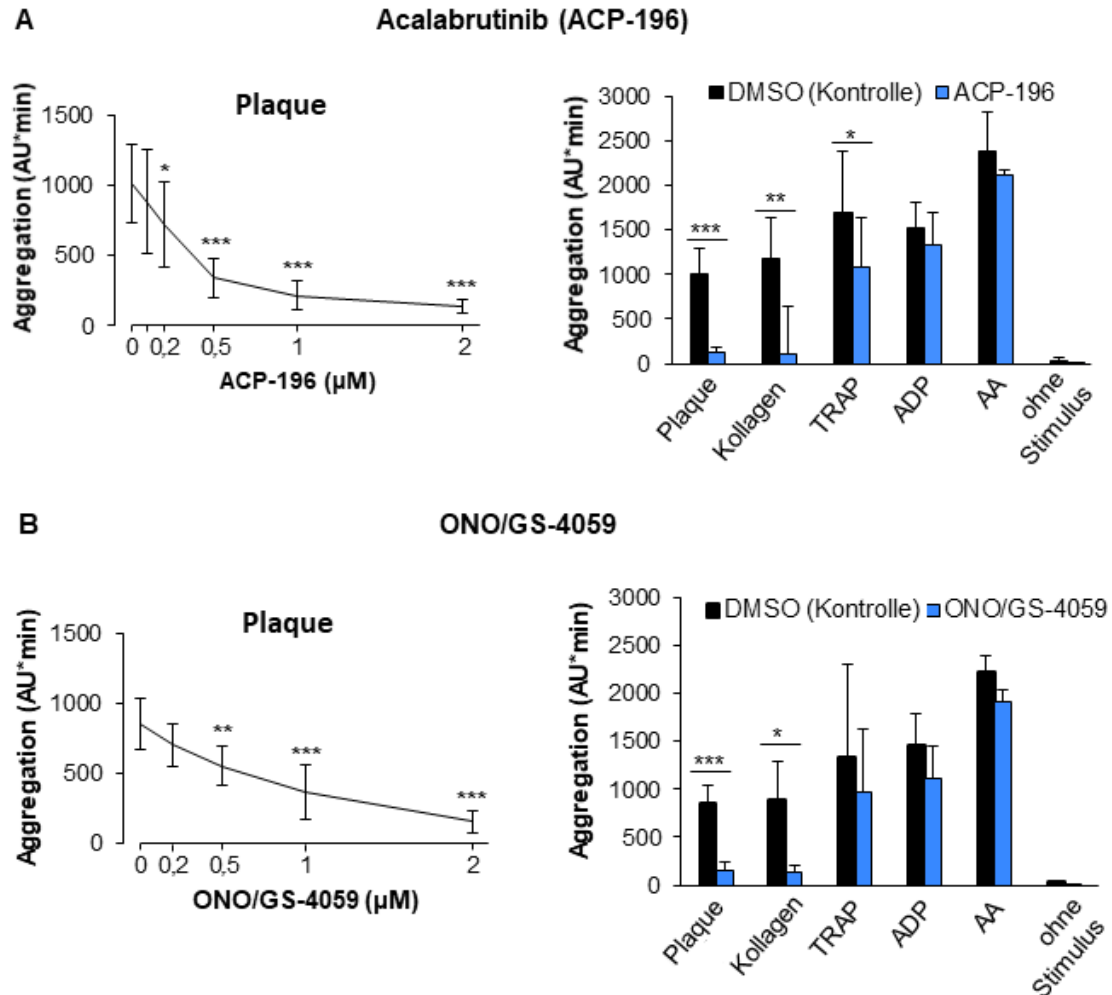


Abbildung 18: Wirkung von Acalabrutinib und ONO/GS-4059 auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Plaquehomogenat, Kollagen, TRAP, ADP und AA.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %, Kontrolle), Acalabrutinib oder ONO/GS-4059 für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaque (833 μg/ml), Kollagen (0,1-0,3 μg/ml), TRAP (5 μM), ADP (5 μM) oder AA (0,6 mM) sowie spontane Aggregation (ohne Stimulation) für 10 min gemessen. Die Kollagenkonzentrationen wurden in jedem Experiment titriert, um eine der Plaque-induzierten Aggregation vergleichbare Aggregation zu induzieren. Links sind Dosis-Wirkungs-Kurven von **(A)** Acalabrutinib und **(B)** ONO/GS-4059 für die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation zu sehen. Rechts sind die Wirkungen von **(A)** Acalabrutinib (2 μM) und **(B)** ONO/GS-4059 (2 μM) auf die Plaque-, Kollagen-, TRAP-, ADP- oder AA-stimulierte sowie spontane Aggregation (ohne Stimulus) in Bardiagrammen dargestellt. MW ± SD, n = 5, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001 für DMSO (Kontrolle) vs. Btk-Inhibitoren. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Die Inhibition der Plaque- und Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation durch Acalabrutinib und ONO/GS-4059 persistierte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 min (Abb. 19).

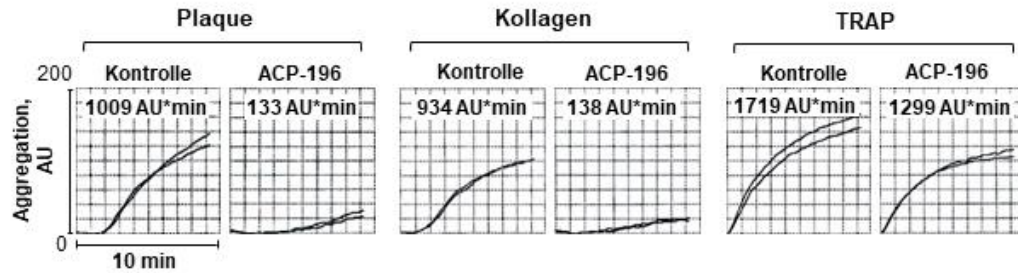
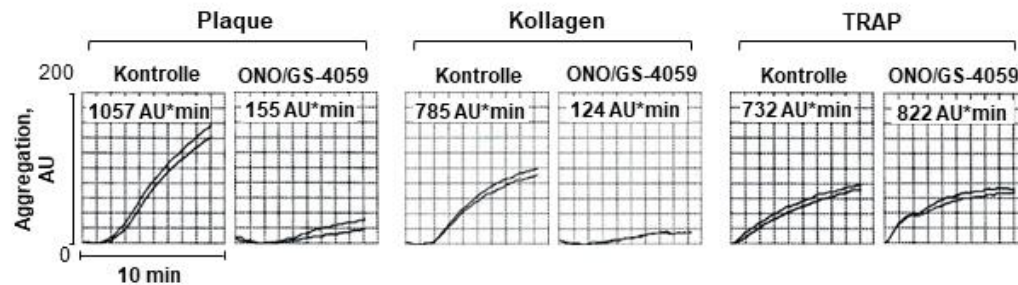
A Acalabrutinib (ACP-196)**B ONO/GS-4059**

Abbildung 19: MEA-Kurven der Plaque-, Kollagen- und TRAP-stimulierten Thrombozytenaggregation im Blut. Wirkungen von Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle), **(A)** ACP-196 (2 μ M) oder **(B)** ONO/GS-4059 (2 μ M) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Plaque (833 μ g/ml), Kollagen (0,3 μ g/ml) oder TRAP (5 μ M) für 10 min erfolgte. Repräsentative MEA-Kurven sind dargestellt. Die Zahlen in den Kurven stehen für kumulative Aggregationswerte (AU*min), welche 10 min nach Beginn der Stimulation gemessen wurden. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Bemerkenswerterweise konnte ein intakter Signalweg über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die durch Btk-Inhibitoren vermittelte Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation aufheben. So wurde durch Zugabe von ADP zu den Blutproben mit Btk-Inhibitoren die hemmende Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Plaque-Aktivierung umgangen (Abb. 20).

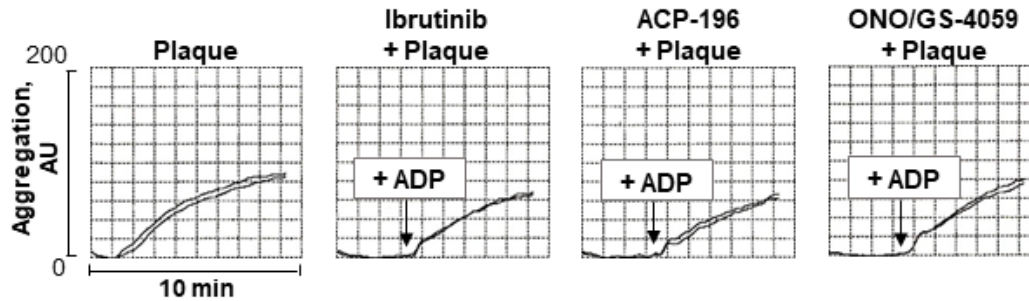


Abbildung 20: ADP-Stimulation hebt hemmende Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation auf.

Die Blutproben wurden mit DMSO (0,1%, Kontrolle), Ibrutinib (1 µM), ACP-196 (2 µM) oder ONO/GS-4059 (2 µM) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Plaque (833 µg/ml) erfolgte. 4 min nach Beginn der Messung der Thrombozytenaggregation wurde zu den Blutproben ADP (5 µM) zugegeben, welches die Hemmung der Plaque-Aktivierung durch Ibrutinib (siehe Abbildungen 15 und 19A, B) aufhob. Repräsentative MEA-Kurven sind dargestellt. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

5.3.2 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen in arteriell fließendem Blut die Plättchenthrombenbildung auf Plaque, jedoch nicht auf Kollagen

Plaquehomogenat, Plaquegewebeschnitte oder fibrilläres Kollagen wurden bei mittleren arteriellen Wandscherraten, die in gesunden Karotis- und Koronararterien (600/s) oder mild-stenosierte Koronararterien (1500/s) beschrieben sind, mit Blut, das zuvor mit Btk-Inhibitoren prä-inkubiert wurde, beströmt¹⁷¹⁻¹⁷³.

Durch Ibrutinib (1 µM) wurde die Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat praktisch vollständig gehemmt ($-98 \pm 1\%$) (Abb. 21A). Die Thrombozytenadhäsion war noch vorhanden und messbar (Abb. 21A, rechts oben). Ebenfalls stark hemmte Ibrutinib die Plättchenthrombenbildung auf Plaquegewebeschnitten ($-76 \pm 16\%$; Abb. 21B). Eine hochsignifikante Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat und Plaquegewebeschnitten wurde sogar noch bei einer niedrigen Ibrutinib-Konzentration von 0,2 µM beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde die maximale Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern durch Ibrutinib nicht gehemmt, sondern sie war nur bei einer Konzentration von 1 µM gering verzögert ($8 \pm 2\%$) (Abb. 21C).

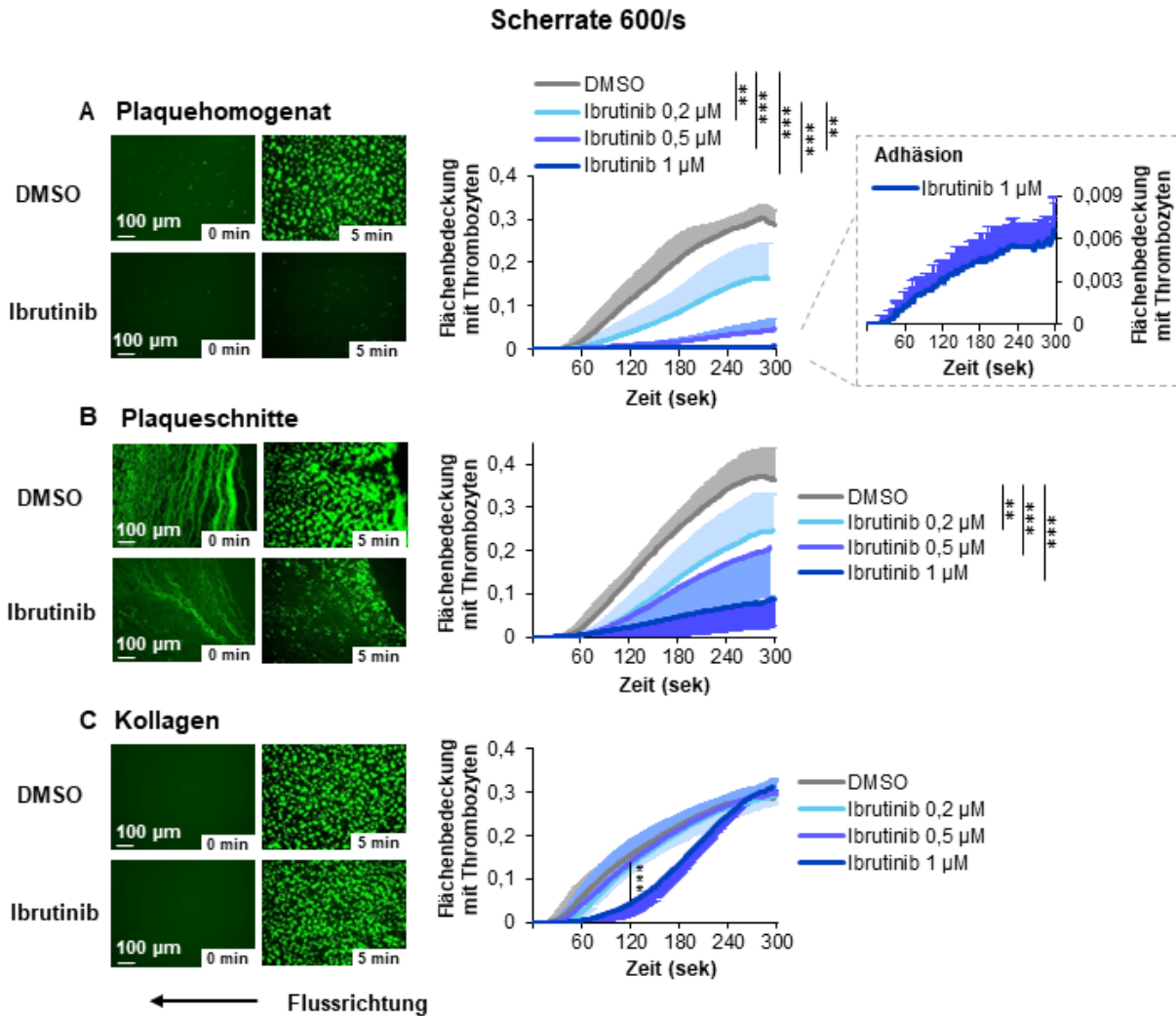


Abbildung 21: Ibrutinib hemmt die Plaque-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchentrombenbildung bei niedriger arterieller Flussgeschwindigkeit (Wandscherrate von 600/s).

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenanfärbung und mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder Ibrutinib für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss durch die Flusskammern mit einer Scherrate von 600/s (entspricht einem Scherstress von 19 dyn/cm²) gestartet wurde. Die Flusskammern enthielten Deckgläschen beschichtet mit Plauehomogenat, Plaqueschnitten oder Kollagenfasern. Die Plättchentrombenbildung wurde über 5 min aufgezeichnet und gemessen. Links zeigen repräsentative mikroskopische Aufnahmen die Plättchentrombenbildung auf (A) Plauehomogenat, (B) Plaqueschnitten und (C) Kollagen am Anfang (0 min) und 5 min nach Flussbeginn sowie die Wirkung von Ibrutinib (1 µM). Rechts sind Liniendiagramme zu sehen, welche die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Ibrutinib auf die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung zeigen. Rechts oben ist dargestellt, dass eine Thrombozytenadhäsion an Plauehomogenat in Anwesenheit von Ibrutinib (1 µM) noch messbar ist (die Y-Skala ist vergrößert). MW ± SD, n = 5, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 für Ibrutinib vs. DMSO (Kontrolle) nach 5 min Blutfluss. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Selbst bei der hohen Scherrate von 1500/s konnte Ibrutinib in geringen Konzentrationen (0,2 und 0,5 µM) die Trombenbildung auf Plauehomogenat effektiv reduzieren (-69 ± 16 % bzw. -93 ± 5 %), während die Plättchentrombenbildung auf Kollagenfasern nicht beeinträchtigt wurde ($-1,2 \pm 5$ % bzw. $1,8 \pm 2$ %) (Abb.

Ergebnisse

22). Plauegewebeschnitte konnten bei hoher Scherrate nicht untersucht werden, da sie unter solchen Flussbedingungen nicht am Deckgläschen haften blieben.

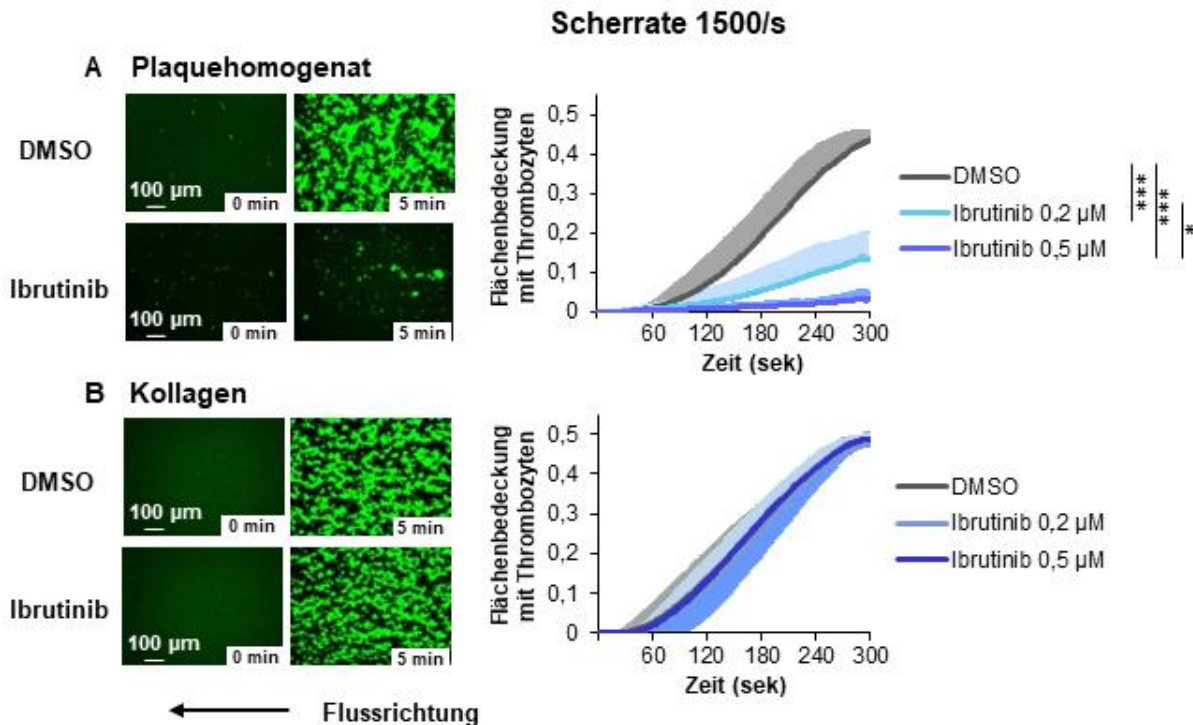


Abbildung 22: Ibrutinib hemmt die Plaque-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchentrombenbildung bei hoher arterieller Flussgeschwindigkeit (Wandscherrate von 1500/s).

Die Blutproben wurden wie in der Abbildung 21 erläutert vorinkubiert, bevor der Blutfluss durch die Flusskammern mit einer Scherrate von 1500/s (entspricht einem Scherstress von 48 dyn/cm²) gestartet wurde. Links zeigen repräsentative mikroskopische Aufnahmen die Plättchentrombenbildung auf (A) Plaquehomogenat und (B) Kollagen am Anfang (0 min) und 5 min nach Flussbeginn sowie die Wirkung von Ibrutinib (0,5 μ M). Rechts sind Liniendiagramme zu sehen, welche die Wirkung von Ibrutinib (0,2 und 0,5 μ M) auf die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung zeigen. MW \pm SD, n = 5, *: p < 0,05; ***: p < 0,001 für Ibrutinib vs. DMSO (Kontrolle) nach 5 min Blutfluss. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Ähnliche Ergebnisse ergab die Untersuchung der neuen Btk-Inhibitoren Acalabrutinib und ONO/GS-4059. Acalabrutinib (0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M) zeigte eine dosis-abhängige Hemmung der Plättchentrombenbildung auf Plaquehomogenat, jedoch nicht auf Kollagenfasern (Abb. 23A, 24B). Hierbei hemmte Acalabrutinib (2 μ M) annähernd vollständig die Plättchentrombenbildung auf Plaquehomogenat (-90 \pm 12 %), jedoch nicht auf Kollagen (25 \pm 29 %). Auch ONO/GS-4059 (5 μ M) verhinderte beinahe komplett die Trombenbildung auf Plaquehomogenat (-91 \pm 13 %), jedoch nicht auf Kollagen (5 \pm 50 %) unter arteriellen Flussbedingungen (Abb. 23B, 24C). Wenn man die Hemmung der

Plättchenthrombenbildung auf Plaque unter arteriellem Fluss durch die 3 verschiedenen Btk-Hemmer vergleicht, hemmte Ibrutinib die Plaque-induzierte Thrombenbildung im Vergleich zu Acalabrutinib und ONO/GS-4059 bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (0,5 μ M Ibrutinib reduzierte die Plättchenthrombenbildung um 83 %, Abb. 21). Bezogen auf die IC_{50} -Werte der Btk-Inhibitoren unter Fluss, war Ibrutinib 2,5- bis 5-fach potenter als Acalabrutinib und 2,5- bis 10-fach potenter als ONO/GS-4059 (Abb. 24).

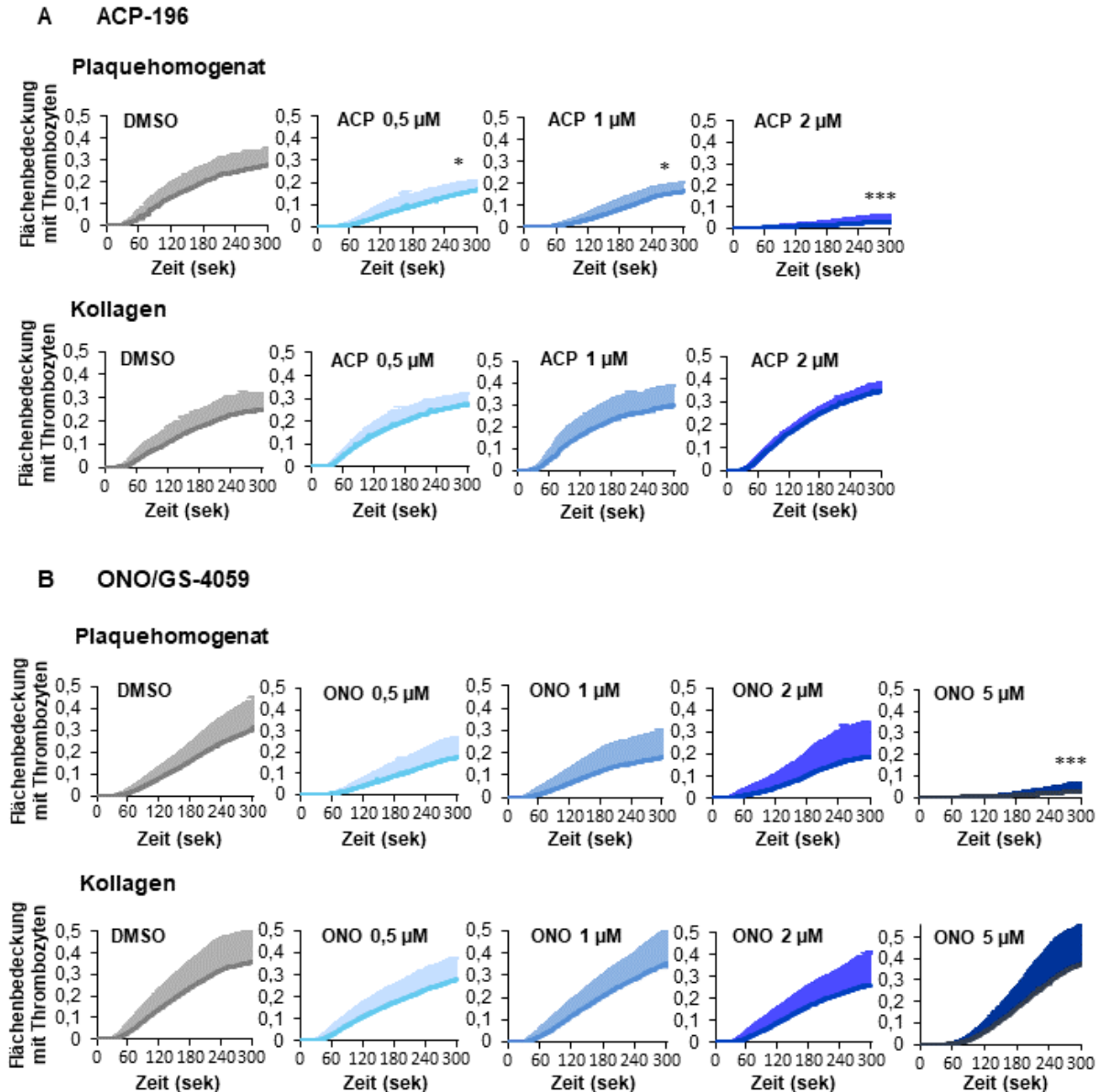


Abbildung 23: Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 hemmen die Plaue-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen.

Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder Acalabrutinib oder ONO/GS-4059 in verschiedenen Konzentrationen (in DMSO gelöst; 0,1 %) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet wurde. Die Liniendiagramme zeigen die Wirkung von (A) Acalabrutinib und (B) ONO/GS-4059 auf die Kinetik der Plaue- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung. MW + SD, n = 5 für ACP; n = 6 für 0,5 µM ONO, n = 6 für 1 µM ONO; n = 7 für 2 µM ONO; n = 7 für 5 µM ONO. *: p < 0,05; ***: p < 0,001 für Btk-Inhibitor vs. DMSO (Kontrolle) nach 5 min Blutfluss. Weitere statistisch signifikante Unterschiede nach paarweisem Vergleich: ACP 0,5 µM vs. ACP 2 µM, p < 0,05; ONO 5 µM vs. ONO 2 µM, p < 0,001; ONO 5 µM vs. ONO 1 µM, p < 0,001; ONO 5 µM vs. ONO 0,5 µM, p < 0,001. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

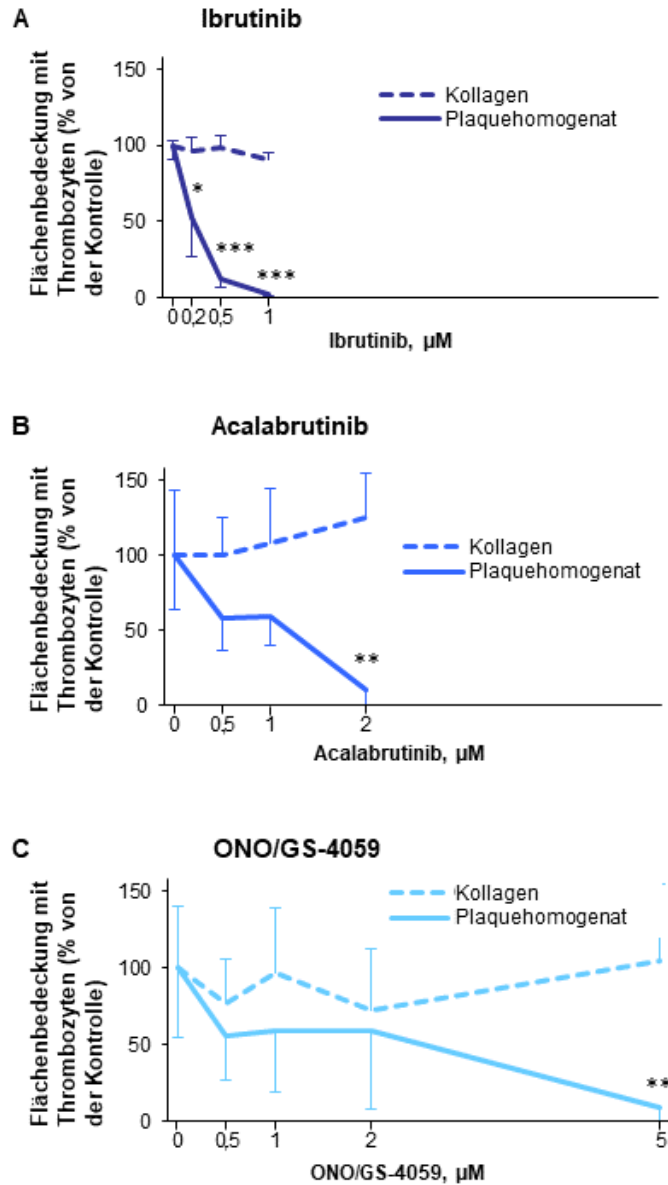


Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Kurven von (A) Ibrutinib, (B) Acalabrutinib und (C) ONO/GS-4059 für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s).

Die Ergebnisse der Experimente gezeigt in den Abbildungen 21 und 23 wurden für den Zeitpunkt 4 min nach Beginn des Blutflusses ausgewertet, und die Kontrollen (DMSO) 100 % gesetzt. MW \pm SD, n = 5-7, *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001 für Kollagen vs. Plaquehomogenat. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

5.3.3 Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 hemmen die Plaque-stimulierte ATP-Sekretion

Um die Rolle der Btk-Inhibition auf die Plaque-vermittelte Thrombozytenaktivierung zu untersuchen, wurde die Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Plaque-induzierte granuläre ATP-Sekretion bestimmt. Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 reduzierten deutlich (~ 90%) die Plaque-stimulierte ATP-Sekretion (Abb. 25).

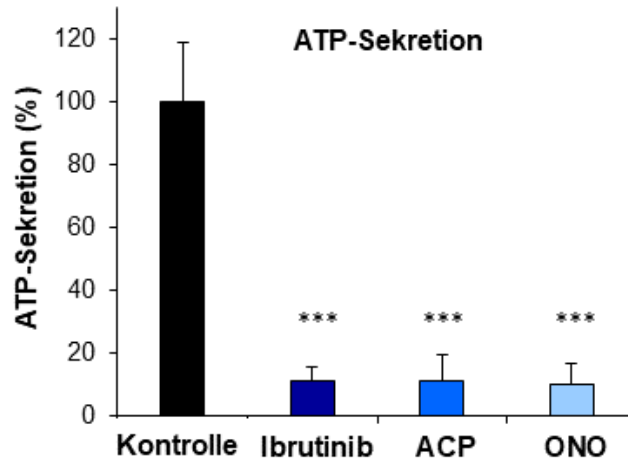


Abbildung 25: Wirkung von Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 auf die Plaque-induzierte thrombozytäre ATP-Sekretion im Blut.

Blutproben wurden mit DMSO (0,1 %, Kontrolle), Ibrutinib (1 μ M), Acalabrutinib (2 μ M) oder ONO/GS-4059 (2 μ M) für 15 min bei 37°C vorinkubiert, bevor die Stimulation mit Plaquehomogenat (833 mg/ml) erfolgte. Der maximale Anstieg der Lumineszenz nach 4 min wurde ermittelt. Es lag bei den Plaque-stimulierten Kontrollen (100%) zwischen 50 und 100 nM ATP. Die Werte sind in % der Plaque-induzierten ATP-Sekretion angegeben. MW + SD, n = 4, ***: p < 0,001 für Kontrolle vs. Btk-Inhibitoren. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

5.3.4 Btk-Inhibition durch Ibrutinib beeinflusst nicht die thrombozytäre Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Funktion

Bei der physiologischen Hämostase spielt neben dem GPVI-Rezeptor auch das Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine bedeutsame Rolle (s. Einleitung). Daher wurde als Nächstes die Auswirkung einer Btk-Inhibition durch Ibrutinib auf die Funktion des Integrin $\alpha_2\beta_1$ untersucht. Hierfür wurde lösliches Kollagen Typ I verwendet, welches ausschließlich an Integrin $\alpha_2\beta_1$ bindet^{94, 95} (s. Kapitel 2.6.2). Lösliches Kollagen Typ I wurde mit Blut unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) beströmt. Durch Zugabe von Abciximab (20 μ g/ml) wurde die Thrombozytenaggregation blockiert, um ausschließlich die $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Thrombozytenadhäsion an lösliches Kollagen zu messen.

Es zeigte sich eine vollständige Hemmung der Thrombozytenadhäsion an lösliches Kollagen Typ I durch den Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -blockierenden Antikörper 6F1. Im Gegensatz dazu hatte Ibrutinib keinen Einfluss auf die $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Thrombozytenadhäsion an lösliches Kollagen (Abb. 26). Dies bestätigt, dass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ die Blutplättchenadhäsion an lösliches Kollagen aufrechterhalten kann, und erklärt wahrscheinlich, warum Ibrutinib in unseren Experimenten die Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -vermittelte Blutplättchenadhäsion an Kollagenfasern unter Fluss, welche für die physiologische Hämostase wichtig ist, nicht beeinträchtigt hat.

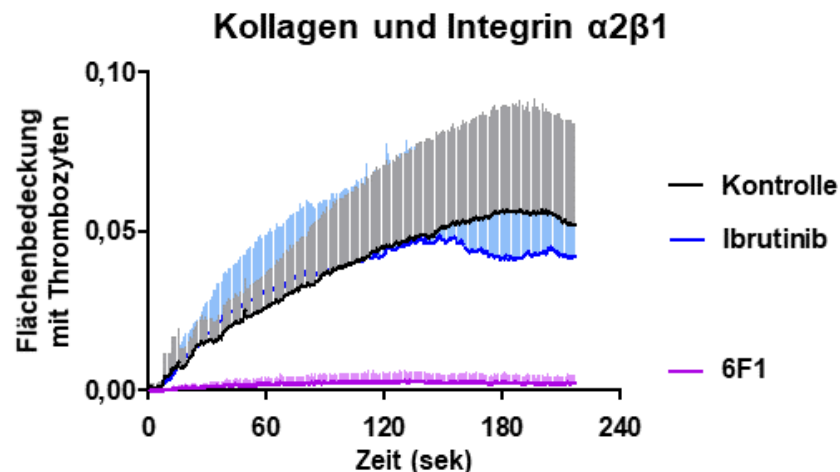


Abbildung 26: Mechanismus der Plaque-selektiven Hemmung der Thrombenbildung durch Ibrutinib unter Fluss: der Anti- $\alpha_2\beta_1$ -Antikörper 6F1, jedoch nicht Ibrutinib, hemmt die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes lösliches Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen.

Blutproben wurden vor dem Flussbeginn mit Abciximab (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sowie DMSO (0,1 %, Kontrolle) oder Ibrutinib (1 μM) oder 6F1 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Blutfluss (Scherrate 600/s) gestartet und die Thrombozytenadhäsion gemessen. MW + SD, n = 4. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

5.3.5 Die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate erfordert die vWF-Bindung an GPIb

Frühere Studien zeigten, dass Btk unter statischen Bedingungen in den vWF/GPIb-Signalweg involviert ist sowie unter arteriellen Flussbedingungen bei der Adhäsion muriner und humaner Thrombozyten an immobilisiertes vWF eine Rolle spielen könnte^{88, 136, 138}. Um den Mechanismus der Plaque-spezifischen Hemmung der Plättchenthrombenbildung durch Ibrutinib unter Fluss mit hoher Scherrate genauer zu verstehen, wurde humanes Blut mit dem monoklonalen Antikörper 6B4, welcher die Interaktion von GPIb α mit vWF blockiert, vorinkubiert⁴⁸. Bei der Perfusion von Plaquehomogenat und Kollagen bei hoher Scherrate wurde die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombenbildung gleichermaßen (um > 95 %) gehemmt (Abb. 27).

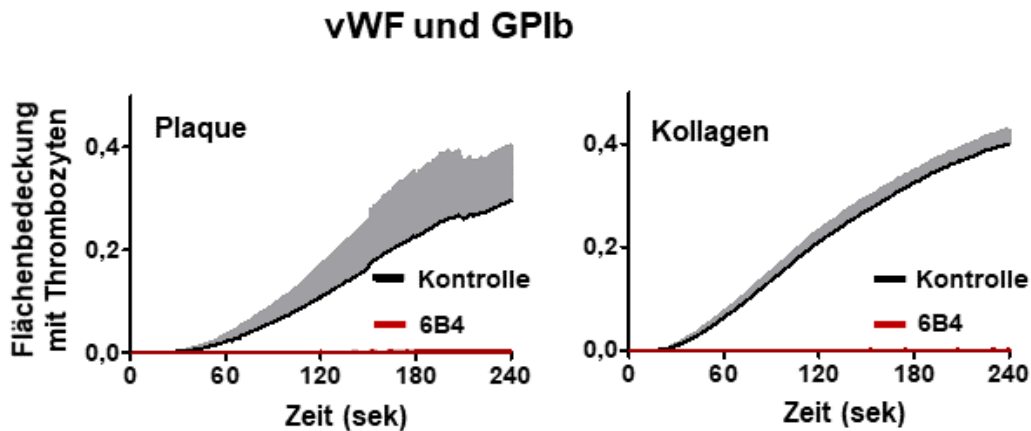


Abbildung 27: Der Anti-GPIIb-Antikörper 6B4 hemmt die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate.

Blutproben wurden mit oder ohne 6B4 (5 µg/ml) vorinkubiert, bevor der Blutfluss mit hoher Scherrate (1500/s) gestartet wurde. MW + SD, n = 4-5. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Hierdurch zeigt sich, dass die vWF-Bindung an GPIIb sowohl für die Plaque- als auch Kollagen-vermittelte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate erforderlich ist. Weiterhin sprechen die erhobenen Ergebnisse dafür, dass die GPIIb-induzierte Btk-Aktivierung für die Thrombenbildung bei hoher Scherrate auf nativen Kollagenfasern entbehrlich ist, da andere Signalmoleküle die Btk-Inhibition kompensieren. Im Falle von Plaque-induzierter Plättchenthrombenbildung ist es unklar, ob die Btk-Aktivierung im GPIIb-signaling bei hoher Scherrate notwendig ist.

5.3.6 Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen und Flussbedingungen im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie

Als Nächstes wurde die Thrombozytenfunktion bei 5 CLL-Patienten unter oraler Ibrutinib-Therapie (3 x 140mg Kapseln Imbruvica® = 420 mg Imbruvica®/Tag) im Vergleich zu 5 Kontroll-Patienten (4 CLL-Patienten und 1 MCL-Patient) ohne Ibrutinib-Therapie untersucht. Die Untersuchung erfolgte paarweise (1 Ibrutinib Patient, 1 Kontrollpatient) am gleichen experimentellen Tag. Es wurden nur Patienten mit Thrombozytenzahlen über $150 \times 10^9/L$ untersucht, um die Messergebnisse durch zu niedrige Thrombozytenzahlen nicht zu beeinflussen. Die Thrombozytenzahlen in beiden Patientengruppen waren ähnlich ($174 \times 10^9 \pm 19 \times 10^9/L$ bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie bzw. $186 \times 10^9 \pm 37 \times 10^9/L$ bei Patienten aus der Kontrollgruppe).

Im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie zeigte sich eine deutliche Hemmung der Plaque- und Kollagen-stimulierten Thrombozytenaggregation ($-89 \pm 7\%$ bzw. $-84 \pm 8\%$) unter statischen Bedingungen (Abb. 28). Auch die Spontanaggregation war signifikant reduziert.

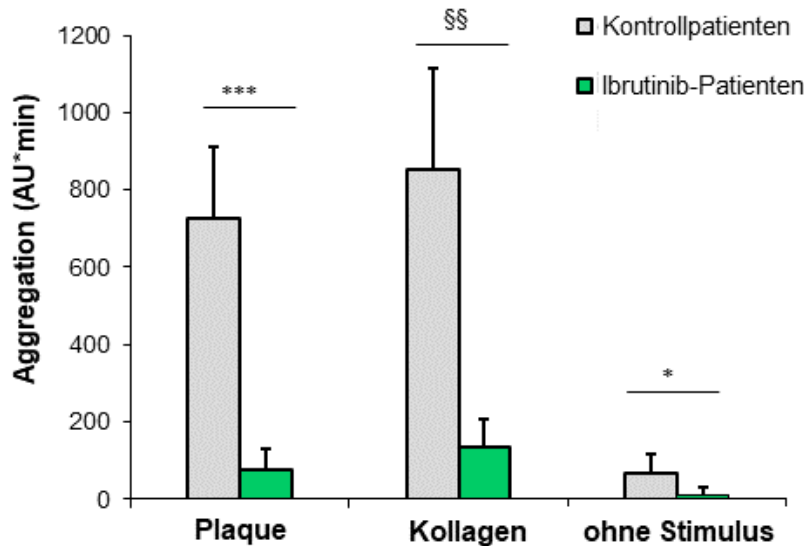


Abbildung 28: Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten statischen Thrombozytenaggregation im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie.

Blutproben von Patienten unter Ibrutinib-Therapie sowie von Kontrollpatienten wurden vor der Stimulation mit Plaquehomogenat (833 $\mu\text{g/ml}$) oder Kollagen (0,15-0,3 $\mu\text{g/ml}$) oder ohne Stimulus für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Die Kollagenkonzentrationen wurden in jedem Experiment titriert, um eine der Plaque-induzierten Aggregation vergleichbare Aggregation zu erhalten. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05; ***: p < 0,001 für sekundären Paarvergleich (Ibrutinib-Therapie vs. Kontrolle); §§: p < 0,01 mit Mann-Whitney-U-Test (Ibrutinib-Therapie vs. Kontrolle). Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Das Blut der o.g. Patienten wurde auch unter arteriellen Flussbedingungen untersucht, wobei Plaquehomogenat, Plaquegewebeschnitte und Kollagenfasern bei einer Scherrate von 600/s beströmt wurden. Ähnlich wie in den *in vitro* Experimenten konnte die Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat durch die Ibrutinib-Therapie verhindert werden (Abb. 29A). Um die Wirkung von Ibrutinib auf die durch Plaquehomogenat stimulierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen zu veranschaulichen, sind 2 repräsentative Videos beigefügt (Videos 3,4). Video 3 zeigt die Kinetik der Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat bei einem Patienten ohne Ibrutinib-Therapie (Kontrolle). Video 4 zeigt die komplette Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat bei einem mit Ibrutinib behandelten Patienten. Hierbei ist eine Thrombozytenadhäsion an Plaquehomogenat, sowohl transient als auch stabil, noch weiterhin zu sehen.

Ebenso war die Plättchenthrombenbildung auf Plaqueschnitten bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie deutlich gehemmt ($-83 \pm 24 \%$) (Abb. 29B, Videos 5,6). Hierbei ist im Video 5 die normale Kinetik der Plättchenthrombenbildung auf einem Plaqueschnitt zu sehen (Kontrollpatient). Im Vergleich dazu zeigen sich im Video 6 mit Blut eines Patienten unter Ibrutinib-Therapie deutlich weniger Plättchenaggregate, die wesentlich kleiner sind als mit dem Blut des Kontrollpatienten. Im Gegensatz dazu war bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie die Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern nur initial etwas verlangsamt, erreichte jedoch dasselbe Ausmaß ($108 \pm 13\%$) wie bei den Kontrollpatienten (Abb. 29C, Videos 7,8). Die Kinetik der Thrombenbildung auf Kollagenfasern im Blut eines Kontrollpatienten ist in dem Video 7 zu sehen. Video 8 zeigt die weiterhin ausgeprägte Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern bei einem Patienten unter Ibrutinib-Therapie und macht deutlich, dass die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung durch Ibrutinib unter arteriellen Flussbedingungen nicht beeinflusst wird.

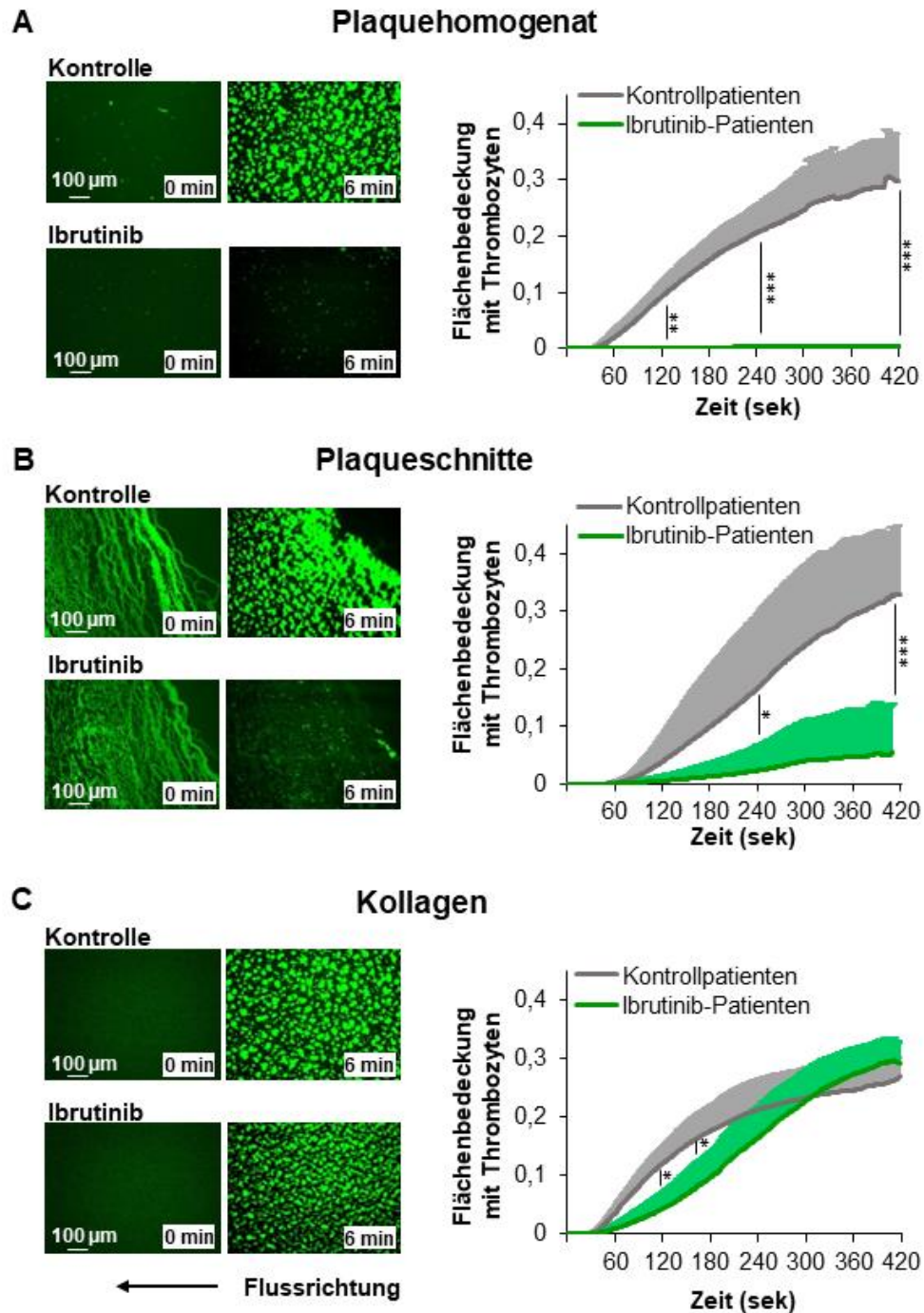


Abbildung 29: Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-vermittelten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie.

(A) Plaquehomogenat, (B) Plaquegewebeschnitte und (C) Kollagen wurden mit Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie oder von Kontrollpatienten beströmt (Scherrate 600/s). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen zeigen Plättchenthromben auf Plaquehomogenat und Plaquegewebeschnitten 6 min nach Flussbeginn bei Kontrollpatienten, nicht aber bei Ibrutinib-Patienten. Bei Kollagen ist kaum ein Unterschied der Plättchenthrombenbildung bei Kontroll- und Ibrutinib-Patienten zu sehen (links). Die Liniendiagramme (rechts) zeigen die Kinetik von Plaque- und Kollagen-induzierter Plättchenthrombenbildung bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie und Kontrollpatienten. MW + SD, n = 5, *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001 für Ibrutinib-Therapie vs. Kontrolle. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

5.3.7 Wirkung von Ibrutinib *ex vivo* auf die Blutungszeit *in vitro*

Um den Einfluss von Ibrutinib auf die Blutungszeit zu untersuchen, wurde das Blut der o.g. Patienten unter Ibrutinib-Therapie sowie von o.g. Kontrollpatienten mittels *platelet function analyzer* PFA-100® untersucht, welcher die primäre Hämostase *in vitro* simuliert, sodass ein potenzielles Blutungsrisiko offenbart werden kann^{166, 174}.

Bei zwei von fünf getesteten Patienten unter Ibrutinib-Therapie lag die Verschlusszeit (*closure time*, CT) bei Verwendung der Epinephrin/Kollagen-Kartusche oberhalb des Normbereichs, wobei die mittlere Verschlusszeit nicht signifikant anstieg (Abb. 30). Bei Verwendung der ADP/Kollagen-Kartusche zeigte sich bei allen Patienten eine normale Verschlusszeit (Abb. 30).

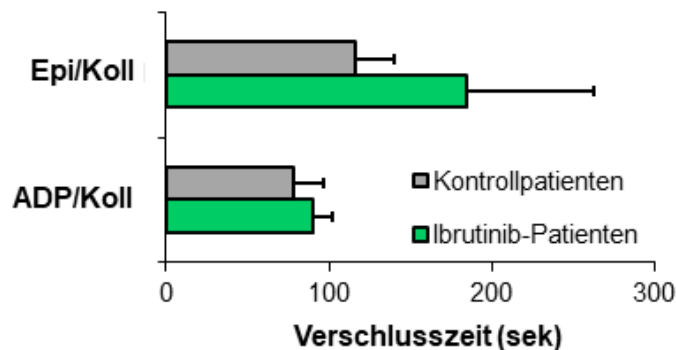


Abbildung 30: Wirkung der Ibrutinib-Therapie auf die *in vitro* Blutungszeit.

Blutproben von 5 Patienten unter Ibrutinib-Therapie und 5 Kontrollpatienten wurden in Küvetten mit Epinephrin/Kollagen (Epi/Koll)- oder ADP/Kollagen (ADP/Koll)-Filter übertragen. Die *in vitro* Verschlusszeit (CT) wurde mit dem PFA-100 (*platelet function analyzer*) gemessen. MW + SD, n = 5. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

5.3.8 Orale Einnahme von niedrigen Dosen Ibrutinib hemmt die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und arteriellem Fluss

Da die Btk-Inhibitoren irreversibel binden, und die Thrombozyten bei fehlendem Zellkern nicht in der Lage zur *De-novo*-Synthese der meisten Proteine sind, stellte sich die Frage, ob durch eine niedrige oder niedrige und intermittierende Dosierung von Ibrutinib *in vivo* die Thrombozyten suffizient gehemmt werden können. Zwei gesunde männliche Probanden nahmen eine Startdosis von Ibrutinib (3 x 140 mg) am Tag 1. ein. Anschließend nahm der Proband A 140 mg Ibrutinib pro Tag für eine Woche ein. Der Proband B nahm 140 mg jeden 2. Tag eine Woche lang ein.

Bereits 3 Stunden nach Einnahme von 420 mg Ibrutinib wurde die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaquehomogenat-Pools um 94 % sowie nach Stimulation mit Kollagen um 91 % im Blut des Probanden A gehemmt (nicht dargestellt). Bei dem Probanden B war die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation 3 Stunden nach Einnahme um 73 % sowie die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation um 58 % reduziert (Abb. 31). Im Gegensatz dazu persistierte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit TRAP, ADP oder AA bei beiden Probanden weiter (nicht dargestellt; Abb. 31).

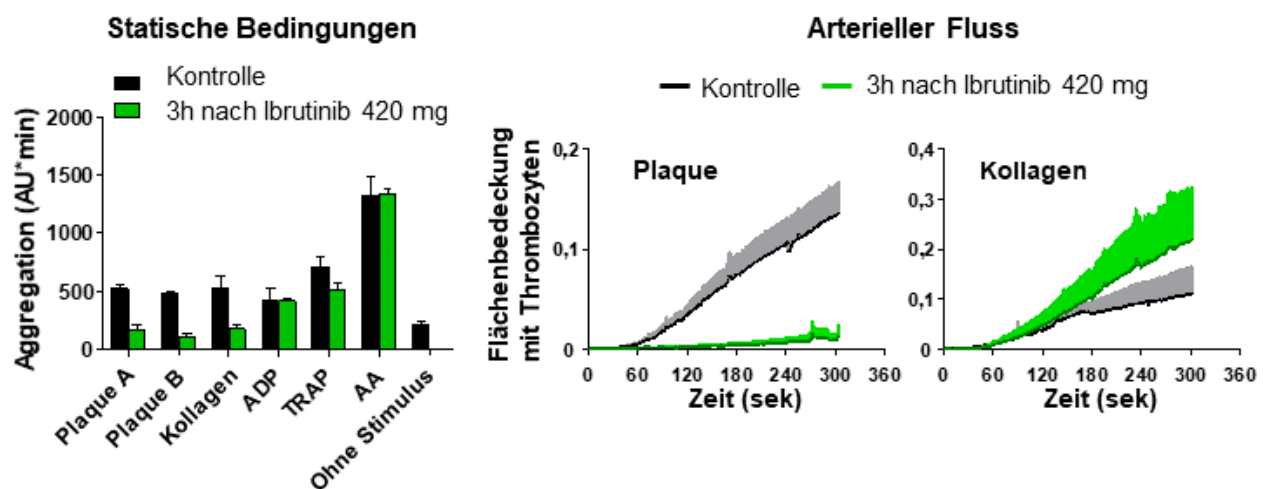


Abbildung 31: Wirkung der oralen Einnahme einer Startdosis von Ibrutinib (420 mg) auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss (Proband B).

Nach der oralen Einnahme von 420 mg Ibrutinib kam es zu einer schnellen Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung. Blutproben wurden vor (Kontrolle, schwarz) und 3 h nach Einnahme von 3 x 140 mg Ibrutinib (grün) abgenommen (Proband B). Links ist die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaquehomogenat-Pools (A und B; 833 µg/ml), Kollagen (0,2 µg/ml), TRAP (5 µM), ADP (5 µM), AA (0,6 mM) oder ohne Stimulus zu sehen. Rechts ist die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) bei dem Probanden B dargestellt. MW + SD von jeweils 3 Messungen. Verändert nach Busygina et al. ¹⁶⁷

Nach einwöchiger Einnahme der niedrigen Dosis von Ibrutinib konnte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaque-Pools um 94 % und 91 % bei dem Probanden A (Ibrutinib 140 mg täglich), bzw. um 93% und 91% bei dem Probanden B (Ibrutinib 140 mg jeden 2. Tag) reduziert werden (Abb. 32). Ebenso zeigte sich eine deutliche Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation – um 91 % bei dem Probanden A bzw. um 82 % bei dem Probanden B (Abb. 32). Im Gegensatz dazu wurde die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP und AA durch Ibrutinib kaum beeinflusst (Abb. 32). Die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation wurde nach oraler Einnahme

Ergebnisse

von Ibrutinib etwas stärker gehemmt, wobei bei dem Probanden A die Hemmung deutlicher als bei dem Probanden B ausfiel (Abb. 32).

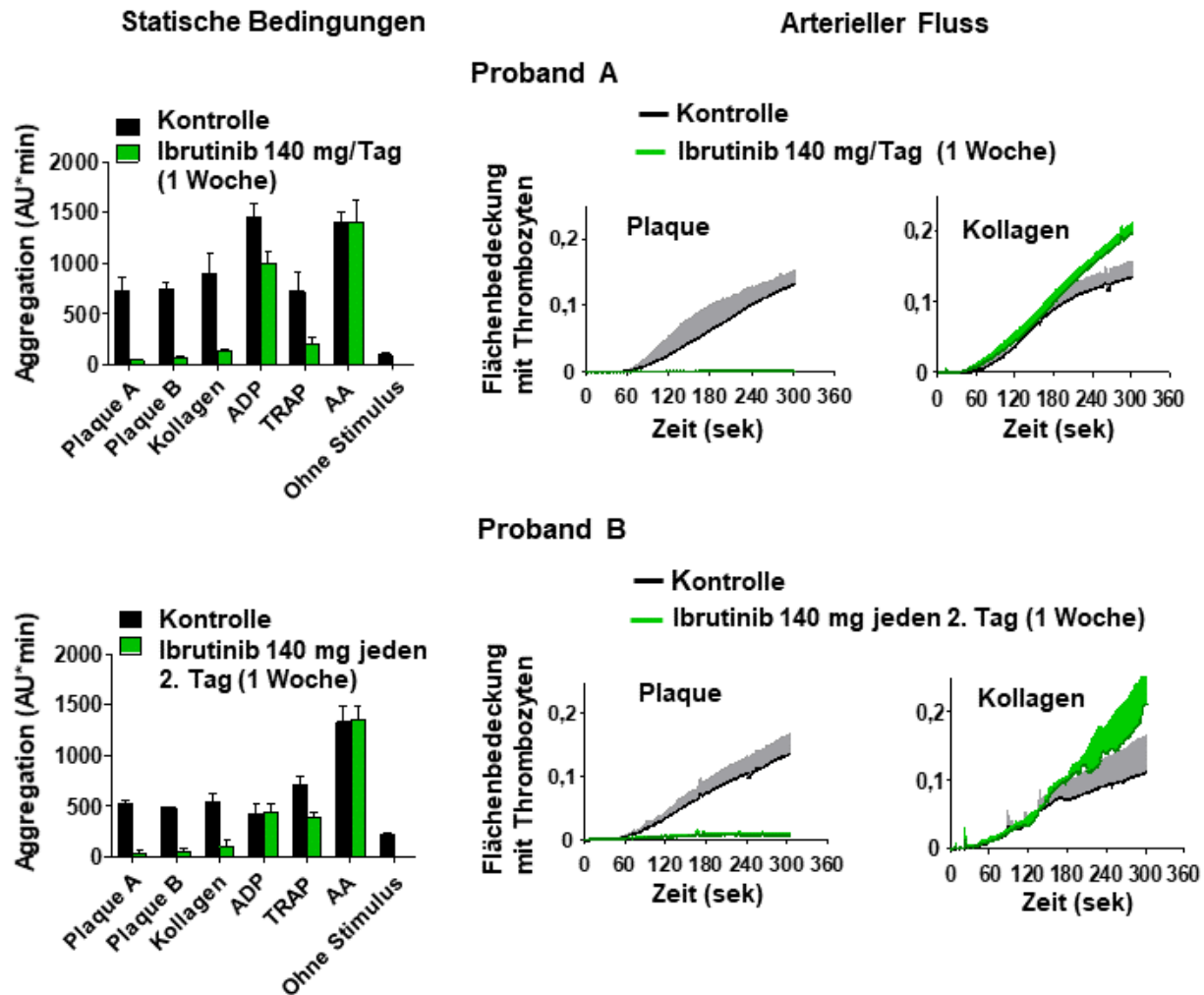


Abbildung 32: Wirkung einer einwöchigen oralen Einnahme von Ibrutinib in niedriger Dosis auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss bei zwei Probanden.

Die Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung wurde durch niedrig-dosierte Ibrutinib-Einnahme für 1 Woche aufrechterhalten. Blutproben wurden vor (Kontrolle, schwarz) und nach einwöchiger Einnahme (grün) von 140 mg Ibrutinib pro Tag (Proband A) oder von 140 mg jeden 2. Tag (Proband B) abgenommen. Links ist die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaquehomogenat-Pools (A und B; 833 µg/ml), Kollagen (0,2 µg/ml), ADP (5 µM), TRAP (5 µM), AA (0,6 mM) oder ohne Stimulus zu sehen. Rechts ist die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) bei den Probanden A und B dargestellt. MW + SD von jeweils 3 Messungen. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation wurde an verschiedenen Tagen während der einwöchigen Einnahme von Ibrutinib (140 mg/Tag) bei dem Probanden A gemessen. Deren Hemmung

betrug hierbei stets > 90 % unabhängig davon, ob die Blutentnahme 23 oder 3 Stunden nach Ibrutinib-Einnahme erfolgte (nicht dargestellt).

Die Blutproben der beiden Probanden wurden auch unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) untersucht. Hier zeigte sich 3 Stunden nach Einnahme von 420 mg Ibrutinib bei beiden Probanden eine deutliche Reduktion der Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat, jedoch nicht auf Kollagen (nicht dargestellt; Abb. 31).

Nach einwöchiger Einnahme der niedrigen Ibrutinib-Dosis (140 mg täglich, Proband A; 140 mg jeden 2. Tag, Proband B) zeigte sich eine annähernd vollständige Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Abb. 32).

Die Ibrutinib-Einnahme (Startdosis bzw. einwöchige Einnahme niedriger Ibrutinib-Dosis) zeigte keinen Einfluss auf das Blutbild (Zahl der Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten) bei beiden Probanden. Die B-Lymphozyten zeigten bei beiden Probanden sogar einen leichten Anstieg (Tabelle 1). Auch die Leberenzyme (GOT, γ GT) wurden durch die Einnahme der niedrigen Dosen von Ibrutinib nicht beeinflusst (nicht dargestellt).

Tabelle 1: Wirkung oraler Einnahme von Ibrutinib auf das Blutbild der Spender A und B.

		Kontrolle	3h nach Startdosis von Ibrutinib (420mg)	1 Woche nach niedrig-dosierter Ibrutinib-Einnahme
Spender A	Erythrozyten, $\times 10^6/\mu\text{l}$	4.2	4.07	4.22
	Hb, g/dl	12.8	12.4	13.0
	Hämatokrit	38.9	36.8	36.7
	Thrombozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	233	247	217
	Lymphozyten, %	37.2	44	45.9
	Monozyten, %	6.9	5.8	8.1
	Neutrophile, %	55.9	50.2	46
	Lymphozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	1.8	2.6	2.9
	Monozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	0.3	0.3	0.5
	Neutrophile, $\times 10^3/\mu\text{l}$	2.8	2.9	2.9
	B-Lymphozyten, %	12.5	14.0; 14.5	18.9; 18.5
Spender B	Erythrozyten, $\times 10^6/\mu\text{l}$	5.26	5.39	4.91
	Hb, g/dl	17.2	17.2	16.1
	Hämatokrit	46.4	47.8	44
	Thrombozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	179	188	160
	Lymphozyten, %	31.2	27.0	29.5
	Monozyten, %	9.4	10.7	12.5

Ergebnisse

	Neutrophile, %	59.4	62.3	58
	Lymphozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	1.7	1.7	2.0
	Monozyten, $\times 10^3/\mu\text{l}$	0.5	0.7	0.9
	Neutrophile, $\times 10^3/\mu\text{l}$	3.3	4.0	3.9
	B-Lymphozyten, %	6.2; 6.0	7.0; 7.3	8.6; 8.5

In früheren Studien konnte die Plaque-induzierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen *in vitro* durch rekombinantes GPVI-Fc oder GPVI-Antikörper effizienter als durch ASS und P2Y₁₂-Antagonisten gehemmt werden^{48, 159}. In dieser Arbeit stellte sich daher die Frage, ob die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung durch die Blockade des GPVI-*signaling* mittels Ibrutinib-Einnahme *ex vivo* effizienter gehemmt werden kann als durch ASS-Einnahme. Daher wurde eine Versuchsreihe mit 2 Probanden durchgeführt, welche niedrig-dosierte ASS (100 mg täglich) für 1 Woche einnahmen. Dabei war der Proband A derselbe wie in den *ex vivo* Versuchen mit Ibrutinib.

Zunächst wurden die Blutproben mittels MEA untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die niedrig-dosierte ASS die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaquehomogenat-Pools weniger effektiv als niedrig-dosiertes Ibrutinib hemmte: die Thrombozytenaggregation unter ASS wurde um 49 % bei dem Probanden A bzw. um 24 % bei dem Probanden C reduziert (Abb. 33). Zudem fand sich eine ausgeprägte Hemmung der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation durch ASS um 63 % sowie um 52 % bei Probanden A bzw. C. Erwartungsgemäß wurde die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit AA deutlich (um 78 % bei dem Probanden A bzw. um 74 % bei dem Probanden C) reduziert, ähnlich den Ergebnissen früherer Untersuchungen¹⁷⁵.

Die Blutproben der beiden Probanden vor und eine Woche nach täglicher Einnahme von ASS wurden auch unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) untersucht. Nach einwöchiger ASS-Einnahme wurde die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung nach 4,5 min Blutfluss beim Probanden A um 64 % sowie beim Probanden C um 53 % reduziert (Abb. 33). Somit wurde die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung durch ASS deutlich weniger effektiv gehemmt als durch Ibrutinib in niedriger Dosis (Abb. 32).

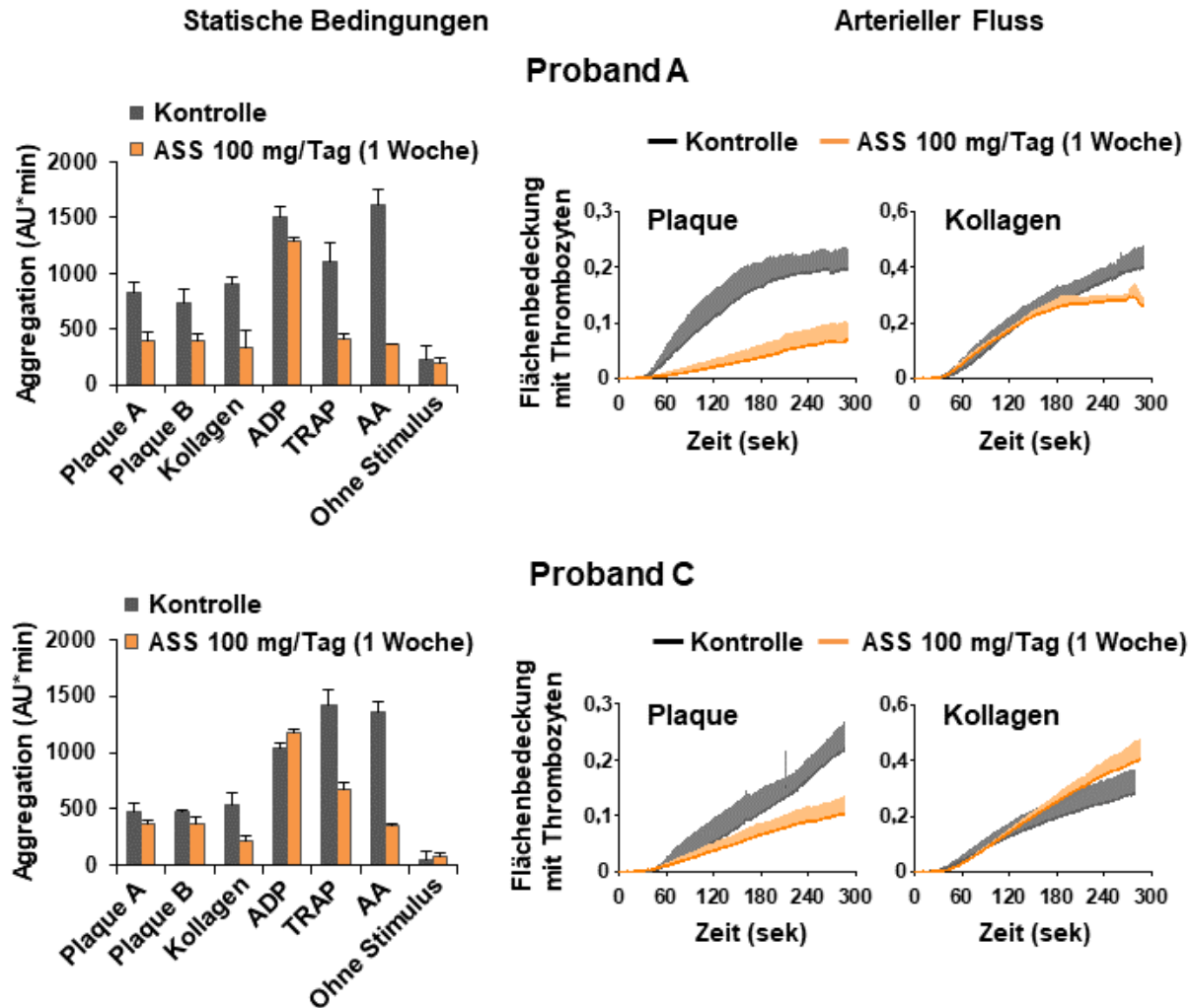


Abbildung 33: Wirkung einer einwöchigen oralen Einnahme von niedrig-dosierter ASS auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und die Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei zwei Probanden.

Blutproben wurden vor (Kontrolle, grau) und nach einwöchiger Einnahme von ASS 100 mg pro Tag (orange) abgenommen. Links ist die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit 2 verschiedenen Plaquehomogenat-Pools (A und B; 833 µg/ml), Kollagen (0,2 µg/ml), ADP (5 µM), TRAP (5 µM), AA (0,6 mM) oder ohne Stimulus zu sehen. Rechts ist die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchentrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s) bei den Probanden A und C dargestellt. Der Proband A ist dieselbe Person wie der Proband A in der Abbildung 32. MW + SD von jeweils 3 Messungen. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

6. Diskussion

Die derzeit eingesetzten antithrombozytären Substanzen (ASS und P2Y₁₂-Antagonisten) senken zwar das Risiko für akute ischämische kardiovaskuläre Ereignisse, tun dies jedoch auf Kosten eines gesteigerten Blutungsrisikos^{61-66, 69, 73, 74}. Daher wären neue therapeutische Ansätze wünschenswert, welche die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung effizient und selektiv, ohne Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase, hemmen. Eine Möglichkeit, die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung effektiv zu hemmen, wäre die Inhibition der im GPVI-Signalweg funktionell beteiligten Tyrosinkinasen, wie der Src-Familien-Kinasen sowie Syk und Btk^{21, 77}. In dieser Dissertation wurde untersucht, ob eine spezifische Hemmung der Plaque-induzierten GPVI-vermittelten Thrombozytenaktivierung durch niedermolekulare Inhibitoren dieser im GPVI-Signalweg beteiligten Tyrosinkinasen erreicht werden kann.

6.1 Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss

In dieser Dissertation wurde die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und arteriellem Fluss untersucht. Zur bestmöglichen Simulation pathophysiologischer Verhältnisse einer Plaque-Ruptur wurden Deckgläschen mit humanem Plaquematerial (Plaqueshomogenat bzw. Plaque-Gefrierschnitten) beschichtet, und unter arteriellen Flussbedingungen bei einer Scherrate von 600/s (entspricht der mittleren Scherrate in Karotis- oder Koronararterien) sowie 1500/s (entspricht der Scherrate in mild-stenosierten Koronararterien) mit Blut beströmt. Es wurden hier meines Wissens zum ersten Mal Plaque-Gefrierschnitte arteriell fließendem Blut exponiert. Die Plaque-Gefrierschnitte mit ihrer feinen rauen Oberfläche könnten bei weitgehend erhaltener Plaque-Architektur ein gutes Modell für die thrombogene Oberfläche eines atherosklerotischen Plaques, die bei einer Plaque-Ruptur generiert wird, darstellen^{50, 176}. Da die Plaque-Gefrierschnitte jedoch nicht chemisch (z.B. mit Formaldehyd) für die funktionellen Flussversuche fixiert werden können, auf Deckgläschen übertragen werden müssen, welche vor dem Flussversuch mit Albuminpuffer gewaschen und blockiert werden, gehen bis zum Flussversuch mit Blut wahrscheinlich Lipide verloren, was die leeren Zwischenräume (schwarz in den Autofluoreszenzbildern) erklären könnte.

Da Intima von gesunden Karotisarterien nicht verfügbar war, wurde fibrilläres Kollagen, eine wesentliche Plättchen-aktivierende Komponente subendothelialer arterieller Intima, verwendet. Dass subendotheliales Kollagen eine zentrale Rolle bei der arteriellen Thrombose nach Verletzung gesunder

Arterien (inkl. der Karotisarterie) *in vivo* spielt, wurde in zahlreichen Untersuchungen an Mäusen mit defizienten oder gehemmten Kollagenrezeptoren (GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$) gezeigt^{143, 177-181}.

Es wurde beobachtet, dass bei der Perfusion von Plaquehomogenat und Kollagen mit Blut unter arteriellen Flussbedingungen die Verteilung der Plättchenthrombi gleichmäßig war. Auf den Plaqueschnitten war die Thrombozytenaggregation und Plättchenthrombenbildung am luminalen Plaque-Rand, wo die Thrombozyten auf den Plaque treffen, wahrscheinlich aus rheologischen Gründen, am stärksten. Auch ansonsten war die Plättchenthrombenbildung auf den Plaqueschnitten inhomogen, was durch teilweise turbulente, nicht-laminare Strömungen auf unebener Oberfläche erklärt werden kann. Interessanterweise zeigten Plaquehomogenat und Plaqueschnitte trotz der Unterschiede in der Verteilung der Plättchenthrombi ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Kinetik und die maximale Bedeckung mit Plättchenthrombi. Auch auf Kollagenfasern waren die Kinetik und die maximale Bedeckung mit Plättchenthromben mit den Ergebnissen mit Plaquehomogenat vergleichbar, wie bereits in früheren Untersuchungen beobachtet⁸.

6.2 Wirkungen von Inhibitoren der Src-Familien-Kinasen (PD173952) und Syk (Syk Inhibitor II, R406) auf die Thrombozytenaktivierung *in vitro*

Src-Familien-Kinasen-Inhibitor PD173952 und Syk Inhibitor II blockierten vollständig die Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion aus den dichten Granula unter statischen Bedingungen (Abb. 2A,B,D, 3, 7A,B,D, 8). In Abwesenheit der Aggregation (durch Zugabe von Abciximab) war die Plaque- und Kollagen-stimulierte Sekretion reduziert, jedoch nicht vollständig gehemmt (Abb. 3, 8). Dies entspricht Ergebnissen früherer Experimente, die gezeigt hatten, dass die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung während der Aggregation die Sekretion verstärkt¹⁶¹. Die zusätzliche Gabe des Syk Inhibitor II zu Abciximab führte zu einer kompletten Inhibition der Plaque- und Kollagen-induzierten ATP-Sekretion (Abb. 8). Die vollständige Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Aggregation durch Syk Inhibitor II ist daher durch eine direkte Hemmung sowohl der Sekretion als auch der Aggregation zu erklären.

Im Gegensatz zu Plaque und Kollagen wurde die TRAP-stimulierte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion durch Syk inhibitor II nur gering gehemmt (Abb. 7C,D, 8). Im Vergleich zu Syk Inhibitor II zeigte PD173952 eine signifikante Hemmung der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation (Abb. 2C,D). Die TRAP-vermittelte ATP-Sekretion war durch PD173952 um 28 %, jedoch nicht signifikant reduziert

(Abb. 3). Die Wirkungen von PD173952 und Abciximab auf die Sekretion waren ähnlich. Durch zusätzliche Gabe von PD173952 zu Abciximab wurde die Hemmung der Sekretion nicht verstärkt. Dies zeigt, dass PD173952 nach TRAP-Stimulation die Sekretion nicht direkt hemmt, und legt den Schluss nahe, dass PD173952 die Sekretion nach TRAP-Stimulation indirekt durch Hemmung des durch Src-Familien-Kinasen vermittelten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Signalwegs reduziert^{101, 168}.

Darüber hinaus wurde die ADP-stimulierte Thrombozytenaggregation durch PD173952, jedoch nicht durch Syk Inhibitor II signifikant gehemmt. Unter statischen Bedingungen im Blut zeigte PD173952 insgesamt eine weniger selektive Hemmung der Thrombozytenaggregation durch verschiedene Stimuli, während Syk Inhibitor II eine deutliche Selektivität für Plaque und Kollagen präsentierte (Abb. 2D und 7D). Die weniger selektive Hemmung der Thrombozytenaggregation durch PD173952 könnte möglicherweise – wie oben erläutert – durch die Hemmung des Src-Familien-Kinasen-vermittelten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-Signalwegs zu erklären sein.

Der andere in dieser Arbeit getestete Syk-Inhibitor R406 zeigte eine vollständige Hemmung der Plaque- und Kollagen-stimulierten GPVI-vermittelten Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen (Abb. 12), ähnlich den Ergebnissen einer früheren Studie mit gewaschenen humanen Plättchen, in der die GPVI-vermittelte durch CRP, Kollagen oder Convulxin induzierte Thrombozytenaggregation mittels R406 gehemmt wurde¹¹⁷. Möglicherweise aufgrund einer hohen Plasmabindung von R406 waren dreifach höhere Konzentrationen von R406 (IC_{50} ca. 7 μM) im Vergleich zu Syk Inhibitor II (IC_{50} ca. 2 μM) notwendig, um eine vergleichbare Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation zu erzielen (Abb. 7 und 12). Im Gegensatz zu Syk Inhibitor II wurde unter R406 auch eine signifikante Hemmung der TRAP- und ADP-induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet. R406 wirkt somit im Vergleich zu Syk Inhibitor II weniger stark und ist weniger selektiv.

Die Hemmung von Plaque- und Kollagen-induzierter Plättchenthrombenbildung durch PD173952, Syk Inhibitor II und R406 unter arteriellen Flussbedingungen offenbarte deutliche funktionelle Unterschiede zwischen Src-Familien-Kinasen- und Syk-Inhibitoren. Im Gegensatz zu PD173952 zeigten Syk Inhibitor II und R406 bei allen getesteten Konzentrationen eine wesentlich stärkere Hemmung der Thrombenbildung auf Plaquehomogenat als auf Kollagenfasern (zum Vergleich Abb. 5A,B, 6, 9-11, 13, Videos 1,2). Syk Inhibitor II erzielte die volle Wirksamkeit und annähernd komplette Hemmung der Plättchenthrombenbildung sowohl auf Plaquehomogenat als auch auf Plaqueschnitten bereits bei einer niedrigen Konzentration von 2 μM (Abb. 11). Die Hemmkonzentrationen von R406 waren möglicherweise aufgrund einer stärkeren Plasmaproteinbindung^{111, 117} deutlich höher als die von Syk Inhibitor II.

Bemerkenswerterweise erzielte Syk Inhibitor II insbesondere in niedrigen Konzentrationen eine Plaque-selektive Hemmung der Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss, ohne die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung zu beeinträchtigen (Abb. 9 und 11). Höhere Konzentrationen von Syk Inhibitor II hemmten zusätzlich die Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern (Abb. 10 und 11). Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, in denen Syk-Inhibitoren die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss hemmten^{118, 120}.

Wie könnte die Plaque-Selektivität von Syk Inhibitor II und R406 insbesondere unter arteriellen Flussbedingungen erklärt werden? Src-Familien-Kinasen und Syk werden im frühen GPVI-*signaling* aktiviert. Wie oben ausgeführt, ist die Plaque- und Kollagen-stimulierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen von der GPVI-Aktivierung abhängig. Daher war die hemmende Wirkung der Src-Familien-Kinasen- und Syk-Inhibitoren auf Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation vergleichbar. Bei der Plättchenthrombenbildung auf isolierten Kollagenfasern unter arteriellem Blutfluss spielt zusätzlich Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine wichtige Rolle^{49, 79}. Im Gegensatz dazu wird die Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat unter arteriellen Flussbedingungen ausschließlich über GPVI vermittelt^{8, 50}. Src-Familien-Kinasen sind auch im Signalweg von Integrin $\alpha_2\beta_1$ beteiligt und vermitteln thrombozytäres *spreading* auf Kollagen⁹⁸. Dies könnte die stärkere Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombusbildung durch PD173952 im Vergleich zu Syk Inhibitor II und R406 unter arteriellem Fluss erklären. Auf der anderen Seite wurde von einer PD173952-resistenten Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -vermittelten stabilen Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen berichtet⁴⁹. Zudem wurde gezeigt, dass die Bindung von GFOGER-Peptid an Integrin $\alpha_2\beta_1$ sowohl die Src-Familien-Kinasen als auch Syk aktiviert⁶. Das heißt zusammengefasst, dass der zugrundeliegende Mechanismus der Plaque-selektiven Hemmung der Plättchenthrombenbildung durch Syk Inhibitor II und R406 im Vergleich zu PD173952 noch zu klären bleibt.

Syk Inhibitor II unterdrückte die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung in beiden Atherothrombose-Modellen (Plaquehomogenat und Plaqueschnitte). Die Hemmung der Plaque-stimulierten Thrombenbildung durch Syk-Inhibition fiel hierbei deutlich stärker aus als sie in früheren Studien unter ASS und P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten – der aktuell etablierten DAPT – beobachtet worden war^{48, 159}. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte vermutet werden, dass die spezifische Hemmung von Syk im GPVI-Signalweg die akute Atherothrombose effektiver und selektiver supprimieren könnte als die DAPT.

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass unter arteriellem Fluss bei hohen Scherkräften (bis zu 100 dyn/cm²), welche an atherosklerotisch verengten Gefäßstellen auftreten, Syk in Thrombozyten verstärkt phosphoryliert wird und die Syk-Aktivierung die Scher-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* vermittelt¹²³. In Anwesenheit der Syk-Inhibitoren OXSI-2 oder Piceatannol wurde eine Reduktion der Scher-induzierten Syk-Phosphorylierung und Thrombozytenaggregation in gewaschenen Thrombozyten unter Scherkräften von 40 sowie 100 dyn/cm² sowie eine Hemmung der Thrombusbildung auf Kollagen Typ III in humanem Vollblut bei 40 dyn/cm² beobachtet¹²³. Es wurde daher vermutet, dass die Scher-induzierte Thrombozytenaktivierung in atherosklerotisch stenosierte Gefäßen und somit auch die Atherothrombose durch Syk-Inhibitoren eventuell verhindert werden kann. Zudem zeigten Andre et al. an Tiermodellen von Kaninchen und Schwein, dass die Plättchenthrombenbildung nach Karotisverletzung *in vivo* durch Syk vermittelt wird und durch einen selektiven Syk-Inhibitor PRT060318 (ebenfalls ein Pyrimidin-5-Carboxamid-Abkömmling wie Syk Inhibitor II) gehemmt werden kann, ohne dabei wesentlich die Hämostase zu beeinträchtigen¹¹⁸. In einer weiteren Studie von Van Eeuwijk *et al.* führte ein oral verabreichter selektiver Syk-Inhibitor BI1002494 zur Verkleinerung des Infarkt-Areals und zur Verbesserung der neurologischen Folgen einer induzierten zerebralen Ischämie bei Mäusen, ohne dass die Schwanzblutungszeit negativ beeinflusst wurde¹¹⁹. Somit könnten selektive Syk-Inhibitoren eine effektive und in Bezug auf Blutungsrisiko sichere anti-atherothrombotische Strategie darstellen.

Wie im Kapitel 2.7.2 ausführlich beschrieben, wurden zahlreiche Syk-Inhibitoren zur Behandlung von rheumatischen und anderen Autoimmunerkrankungen sowie von non-Hodgkin-Lymphomen und CLL entwickelt¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Die meisten von ihnen sind kompetitive Inhibitoren der ATP-Bindungsstelle von Syk. Eine in dieser Arbeit getestete Substanz R406 und ihr orales wasserlösliches Prodrug R788 (umbenannt in Fostamatinib) wurden zur Behandlung von experimenteller und rheumatoider Arthritis getestet^{113, 182, 183}. Syk-Inhibitoren führten in klinischen Studien zu keinem Anstieg des Blutungsrisikos^{107, 122}. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigten Mäuse mit fehlender Syk-Expression in hämatopoetischen Zellen, inklusive Thrombozyten, eine normale Schwanzblutungszeit¹²¹. R788 (das Prodrug von R406) und ein weiterer Syk-Inhibitor PRT060318 wurden sogar erfolgreich für die Behandlung von autoimmunen Thrombozytopathien in Mäusen und bei Menschen getestet^{116, 184}.

Interessanterweise wurde in einer Studie von Braselmann *et al.* bei Menschen keine Wirkung von oral verabreichtem R406 auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation festgestellt¹¹¹. Möglicherweise ist die fehlende Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch R406 in dieser Studie auf eine zu niedrige Plasmakonzentration von R406 zurückzuführen: die maximale Plasmakonzentration von R406 nach Einnahme von 400 mg/Tag lag bei ca. 2000 ng/ml (entspricht 3,18 µM)¹¹¹, was ca. 5mal

geringer ist als die Konzentration, die in unseren *in vitro* Experimenten die Kollagen-stimulierte Thrombozytenaggregation komplett hemmte. In den Versuchen mit Plaquehomogenat betrug der IC_{50} -Wert von R406 ca. 7 μM für die Hemmung der Aggregation unter statischen Bedingungen (Abb. 12A), und ca. 10 μM für die Hemmung der Plaque-induzierten Plättchenthrombusbildung unter Flussbedingungen (Abb. 13). Nach Einnahme des Prodrug Fostamatinib (400 mg/Tag oder 160 mg täglich für 1 Woche) lagen die maximal erreichten Plasmaspiegel von R406 sogar nur bei 1000 ng/ml (entspricht 1,59 μM)¹⁸⁵. Es ist daher unwahrscheinlich, dass diese Dosis von Fostamatinib ausreicht, um die Thrombozytenaggregation im Blut zu hemmen.

Syk-Inhibitoren könnten durch Störung der Syk-Funktion in anderen hämatopoetischen Zellen, insbesondere in Lymphozyten und Neutrophilen, unerwünschte Nebenwirkungen auf das Immunsystem und die entzündliche Abwehr haben¹⁰. Dieses Problem könnte man durch Entwicklung von irreversiblen Syk-Inhibitoren umgehen. Bei fehlendem Zellkern sind die Thrombozyten nur eingeschränkt zur *De-Novo*-Enzymsynthese fähig. Kovalente Syk-Inhibitoren würden die Blutplättchen, die während der Absorptionsphase in den Pfortaderkreislauf gelangen, ähnlich der Situation nach Einnahme von niedrig-dosierter ASS, irreversibel inaktivieren¹⁸⁶. Dadurch könnte eine relativ selektive Syk-Hemmung vorzugsweise in Thrombozyten *in vivo* erreicht werden. Wie oben ausgeführt, führten Syk-Inhibitoren sowohl in Tierexperimenten^{111, 118-120} als auch in klinischen Studien^{107, 122} zu keinem Anstieg des Blutungsrisikos.

6.3 Wirkungen von Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059) auf die Thrombozytenaktivierung *in vitro* und *ex vivo*

Es wurde nach einem irreversiblen Tyrosinkinasehemmer gesucht, der die Thrombozyten für ihre Lebensdauer hemmen würde. Ein irreversibler Tyrosinkinasehemmer könnte die Thrombozyten selektiv hemmen, da eine *De-Novo*-Enzymsynthese in den Thrombozyten nur eingeschränkt möglich ist und die anderen kernhaltigen Zellen die Tyrosinkinasen kontinuierlich nachbilden können. Ein kovalenter Tyrosinkinaseinhibitor könnte dann in niedrigen Dosen verabreicht werden, während der Absorptionsphase in die Thrombozyten im Pfortaderkreislauf gelangen, und das Enzym dort irreversibel inaktivieren. Es wurde gefunden, dass es in der Tat irreversible Tyrosinkinasehemmer gibt, die erfreulicherweise sogar eine Tyrosinkinase hemmen, welche im GPVI-Signalweg involviert ist: Btk. Wie in der Einleitung (Kapitel 2.7.3) ausgeführt, ist Btk im distalen GPVI-*signaling* beteiligt und trägt zur Aktivierung der PLC γ 2 bei^{21, 77}. Es stellte sich daher zunächst die Frage, ob Btk-Inhibitoren die Plaque-

induzierte Thrombozytenaktivierung hemmen, und vor allem, wie stark ausgeprägt die Hemmung ist, da ja Btk im GPVI-Signalweg nicht essentiell, sondern nur beteiligt ist. Falls eine gute Hemmung zu sehen wäre, wäre dann die nächste Frage, ob die Hemmung selektiv für die Plaque-Aktivierung ist. Es wurde der für die Therapie der CLL und MCL zugelassene irreversible Btk-Inhibitor Ibrutinib *in vitro* und *ex vivo* untersucht, und mit den neuen reversiblen Btk-Inhibitoren (Acalabrutinib und ONO/GS-4059) verglichen.

Es wurde gefunden, dass Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 *in vitro* sowie Ibrutinib *ex vivo* unter statischen Bedingungen die GPVI-vermittelte Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut vollständig hemmen, wobei die durch ADP und AA stimulierte, über GPCR-Aktivierung vermittelte Thrombozytenaggregation auch bei höheren Inhibitor-Konzentrationen kaum beeinflusst wurde (Abb. 14, 18, 31, 32). Die erhobenen Ergebnisse stimmen mit den Daten aus 2 vorangehenden Studien überein, die gezeigt hatten, dass Ibrutinib die Kollagen-, jedoch nicht die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP hemmte^{136, 137}. Zudem konnte die Stimulation des ADP-induzierten Signalwegs über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die durch Btk-Inhibitoren vermittelte Hemmung der Plaque-stimulierten Thrombozytenaggregation umgehen (Abb. 20). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass das GPVI-*signaling* durch die Btk-Inhibitoren komplett gehemmt wird, aber das *signaling* über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch diese nicht beeinflusst wird.

Alle 3 getesteten Btk-Inhibitoren zeigten zudem eine starke Hemmung der thrombozytären ATP-Sekretion unter statischen Bedingungen (Abb. 25). Dies deutet darauf hin, dass die Btk-Inhibitoren die Thrombozytenaggregation zumindest zum Teil über die Blockade der ATP-Sekretion hemmen könnten.

In den Flussexperimenten, in denen Plaquehomogenat und Plaqueschnitte mit Blut beströmt wurden, zeigte sich in Anwesenheit von Ibrutinib eine starke Dosis-abhängige Hemmung der Plaque-induzierten Plättchenthrombenbildung sowohl bei einer niedrigen Scherrate von 600/s wie in gesunden Koronararterien (Abb. 21A,B und 24A) als auch bei einer hohen Scherrate von 1500/s wie in mittelgradig stenosierten Koronararterien (Abb. 22A). Im Vergleich zu atherosklerotischem Plaquematerial wurde die Plättchenthrombenbildung auf fibrillärem Kollagen durch Ibrutinib in allen getesteten Konzentrationen bei den beiden Wandscherraten (600/s, Abb. 21C und 24A, bzw. 1500/s, Abb. 22B) praktisch nicht beeinflusst.

Bemerkenswert ist, dass die Plaque-selektive Hemmung der Thrombozytenaktivierung auch im Blut der Patienten unter Ibrutinib-Therapie beobachtet wurde (Abb. 29). Hier war die Hemmung der Plaque-induzierten Plättchenthrombenbildung sogar noch ausgeprägter als in *in-vitro*-Versuchen. Die durchschnittliche Plasmakonzentration von Ibrutinib bei CLL-Patienten, die 420 mg Ibrutinib pro Tag einnehmen, liegt bei ca. 0,31 μM ^{187, 188}. Im Blut dieser Patienten kam es zu einer kompletten Hemmung

der Plaque-induzierten Plättchenthrombenbildung (Abb. 29A,B). Im Vergleich dazu waren *in vitro* höhere Konzentrationen von Ibrutinib (0,5-1 μ M) notwendig, um die Plaque-stimulierte Plättchenthrombenbildung vollständig zu hemmen (Abb. 21A,B). Somit wurde im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie eine Plaque-selektive Hemmung der Thrombozytenaggregation bei einer deutlich niedrigeren Ibrutinib-Konzentration erreicht.

Besonders hervorzuheben ist, dass bei gesunden Probanden bereits 3 Stunden nach Einnahme einer Startdosis von Ibrutinib (420 mg) sowie über die gesamte Dauer (1 Woche) der Einnahme einer niedrigen Ibrutinib-Dosis (140 mg/Tag bzw. 140 mg jeden 2. Tag) eine sehr effektive und Plaque-selektive Hemmung der Thrombozytenaktivierung beobachtet wurde (Abb. 31, 32). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten einer neuerlichen *in-vitro*-Studie, die zeigte, dass eine prolongierte Prä-Inkubation der Btk-Inhibitoren Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 deren thrombozytenhemmende Potenz steigert, so dass niedrige Konzentrationen dieser Btk-Hemmer im Blut für die Hemmung der GPVI-induzierten Thrombozytenaktivierung ausreichen, und viel niedriger waren als die Plasmaspiegel nach Behandlung von Patienten mit B-Zell-Leukämien mit diesen Btk-Inhibitoren¹⁸⁹.

Bei der Untersuchung der neuen selektiveren Btk-Inhibitoren Acalabrutinib und ONO/GS-4059 wurden ähnliche Ergebnisse erhoben: die Plaque-stimulierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen wurde durch die beiden neuen Btk-Inhibitoren Dosis-abhängig gehemmt, während die Kollagen-induzierte Thrombenbildung unbeeinflusst persistierte (Abb. 23, 24B,C).

Was könnte der Plaque-selektiven Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Btk-Inhibitoren unter arteriellen Flussbedingungen zugrunde liegen? Btk-Inhibitoren hemmen das distale GPVI-*signaling* durch irreversible Blockade von Btk. Mittels immobilisierten löslichen Kollagens, das ausschließlich an Integrin $\alpha_2\beta_1$ bindet, wurde demonstriert, dass die Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -abhängige Thrombozytenadhäsion durch Ibrutinib nicht beeinflusst wird (Abb. 26). Beim arteriellen Blutfluss über natives fibrilläres Kollagen ist Integrin $\alpha_2\beta_1$ unabdingbar für die initiale Thrombozytenadhäsion an Kollagen und ergänzt die Rolle des GPVI bei der Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern (Abb. 34)^{11, 49, 79, 190}. Somit ist Integrin $\alpha_2\beta_1$ neben GPVI essenziell für die physiologische Hämostase nach traumatisch bedingter Gefäßwandverletzung, die zur Freilegung nativer Kollagenfasern führt. Bei einer Plaque-Ruptur werden – im Gegensatz zu der physiologischen Hämostase – modifizierte Kollagenstrukturen freigelegt, die die Thrombozytenaktivierung über GPVI, jedoch nicht über Integrin $\alpha_2\beta_1$ stimulieren (Abb. 34)^{8, 50}. Zudem binden Plaque-Kollagenstrukturen im Vergleich zu fibrillärem Kollagen geringer rekombinantes GPVI⁵⁰.

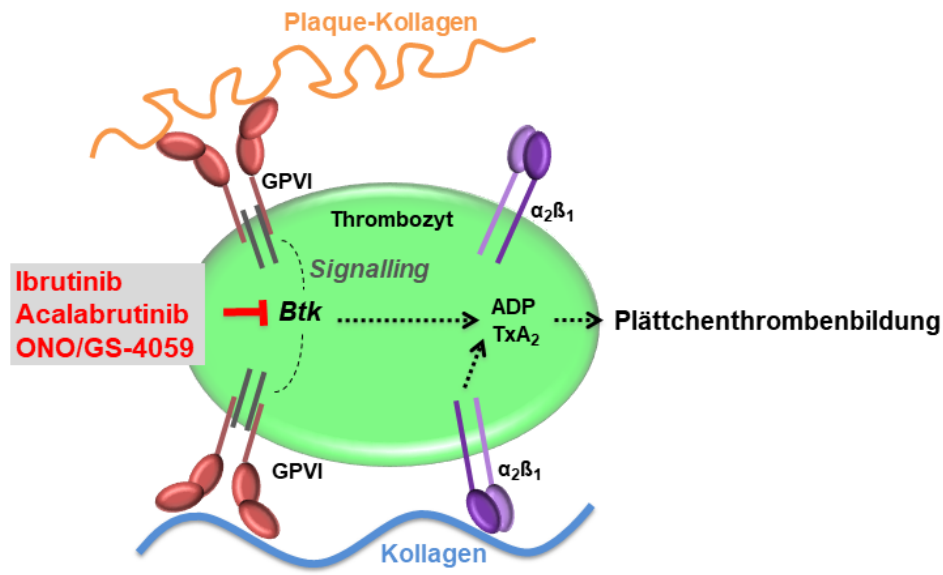


Abbildung 34: Modell einer Plaque-selektiven Hemmung der Plättchenthrombenbildung durch Btk-Inhibitoren. TxA₂ entspricht Thromboxan A₂. Verändert nach Busygina et al.¹⁶⁷

Die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung setzt sich aus der GPVI-stimulierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation sowie der darauf folgenden TF-vermittelten Koagulation mit Bildung von Thrombin und Fibrin zusammen, wobei die Blockade des ersten Schrittes für die Hemmung der Plaque-induzierten Thrombenbildung entscheidend ist⁴². Btk-Inhibitoren sind somit die ersten oral verfügbaren Substanzen, die den initialen Schritt der Atherothrombose spezifisch blockieren können.

Wie in früheren Experimenten beschrieben, spielt Btk eine Rolle im vWF/GPIb-signaling sowie bei der Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes vWF unter arteriellen Flussbedingungen in Mäusen und Menschen^{88, 136, 138}. In dieser Dissertation zeigte sich in Anwesenheit von Ibrutinib eine deutliche Dosis-abhängige Hemmung der Ristocetin-induzierten statischen Thrombozytenaggregation, welche von der vWF-Bindung an thrombozytäres GPIb abhängig ist (Abb. 16). Mittels des monoklonalen Antikörpers 6B4, der die Interaktion von GPIb α mit vWF blockiert, wurde gezeigt, dass die vWF-Bindung an GPIb sowohl für die Plaque- als auch Kollagen-vermittelte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate (1500/s) erforderlich ist (Abb. 27). Ibrutinib (0,5 μ M) verhinderte komplett die Plättchenthrombenbildung auf Plaque bei der hohen Scherrate von 1500/s (Abb. 22A), während die Kollagen-induzierte Thrombenbildung unter denselben Flussbedingungen durch Ibrutinib nicht beeinflusst wurde (Abb. 22B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Btk-Aktivierung im GPIb-signaling für die Plättchenthrombenbildung auf fibrillärem Kollagen offenbar nicht essentiell ist, da wahrscheinlich andere

Signalmoleküle hier die gehemmte Btk-Funktion kompensieren können. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die GPIb-induzierte Btk-Aktivierung zur Thrombozytenrekrutierung an atherosklerotisches Plaquematerial bei hoher Scherrate beiträgt⁴⁸.

Aus früheren Studien wurde berichtet, dass Btk im Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Signalweg von Thrombin-aggregierten gewaschenen Thrombozyten aktiviert wird, und dass Ibrutinib das thrombozytäre Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -*outside-in-signaling* auf immobilisiertem Fibrinogen hemmt^{134, 135}. Dies könnte der Grund für die Hemmung der spontanen Thrombozytenaggregation und die maximal 30%-ige Reduktion der durch niedrige Konzentrationen von TRAP (5 μ M) induzierten Thrombozytenaggregation durch Btk-Inhibitoren *in vitro* sein (Abb. 14, 18). Auch die variable Reduktion der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation *ex vivo* nach niedrig-dosierter Ibrutinib-Einnahme könnte dadurch erklärt werden (Abb. 31, 32). In einer anderen Studie war die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patienten unter Ibrutinib- oder Acalabrutinib-Therapie jedoch nicht beeinträchtigt¹⁹¹. Im Vergleich zu Btk-Inhibitoren hemmt Vorapaxar, ein therapeutisch zugelassener PAR-1-Antagonist, in einer Dosis von 2,5 mg/Tag die Thrombozytenaggregation im Blut um 93 % nach Stimulation mit einer hohen TRAP-Konzentration (15 μ M)¹⁹². Es wurde gezeigt, dass die durch hohe TRAP-Konzentrationen (15 μ M) induzierte Thrombozytenaggregation durch Btk-Inhibitoren nicht gehemmt wird¹⁹³. Die in dieser Arbeit ebenfalls getestete durch einen PAR-4-Agonisten stimulierte Thrombozytenaggregation wurde durch alle 3 untersuchten Btk-Inhibitoren nur wenig beeinflusst (Abb. 17). In Zusammenschau der erhobenen Daten ist eine Reduktion der Thrombin-induzierten Thrombozytenaggregation durch Btk-Inhibitoren im Blut daher eher unwahrscheinlich. Die Btk-Aktivierung im Integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -*outside-in*-Signalweg in aggregierenden Thrombozyten¹³⁴ erscheint generell nicht funktionell bedeutsam, da Btk-Defizienz in Thrombozyten von XLA-Patienten und Btk-Inhibitoren die Thrombozytenaggregation nach GPCR-Stimulation nicht beeinflussen¹⁹³.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die akute okkludierende Atherothrombose durch die Btk-Hemmung in GPVI- und GPIb-Signalwegen effektiv und lokalisiert, ohne wesentliche Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase verhindert werden könnte. Die durchschnittliche Verschlusszeit (*clotting time*, CT) im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie wurde im PFA-100, welcher die primäre Hämostase simuliert, nicht signifikant verlängert (Abb. 30). Nur bei 2 Patienten zeigte sich eine prolongierte Verschlusszeit mit der Kollagen/Epinephrin-Kartusche. Eine deutliche Verlängerung der Verschlusszeit mit dieser Kartusche wird in der Regel nach ASS-Einnahme beobachtet¹⁷⁴. Eine vor kurzem durchgeführte Studie, in der neue Ibrutinib-Analoga an nicht-humane Primaten oral verabreicht wurden, stellte ebenfalls

keine Verlängerung der Hautblutungszeit fest¹⁴⁰. Hervorzuheben ist außerdem, dass Patienten mit XLA mit genetischem Btk-Mangel keine Blutungsneigung aufweisen^{141, 194}.

Beim Vergleich der Thrombozyten-hemmenden Wirkung von Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 *in vitro* wurden keine grundsätzlichen Unterschiede festgestellt. Ibrutinib war jedoch in geringeren Konzentrationen als Acalabrutinib und ONO/GS-4059 wirksam. In früheren Studien wurden *off-target*-Effekte von Ibrutinib, wie die Hemmung von Src-Familien-Kinasen (Yes, Fyn, Lyn) und Tec (wie Btk gehört Tec zu Tec-Familien-Kinasen) beschrieben^{125, 169}. Eine Hemmung von Src- und Lyn-Kinase durch hohe Konzentrationen von Ibrutinib, nicht jedoch von Acalabrutinib wurde ebenfalls in gewaschenen Thrombozyten gefunden^{191, 195}. In Kinase-Inhibitor-Tests zeigte sich Acalabrutinib in Bezug auf Btk-Hemmung spezifischer als Ibrutinib¹⁶⁹. Neuere Studien zeigen jedoch, dass Acalabrutinib, so wie Ibrutinib, in höheren Konzentrationen sowohl in verschiedenen *kinase platforms* als auch in Thrombozyten zusätzlich zu Btk auch Tec hemmt^{187, 191}. Laut Untersuchungen in der *Kinomescan platform* bindet ONO/GS-4059 mit ähnlich hoher Affinität an Btk und Tec¹³⁰. Eine frühere Studie zeigte, dass die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Mäusen mit fehlender Expression von Btk und Tec deutlich stärker gehemmt ist, als die Aggregation der Mausthrombozyten mit alleinigem Fehlen von Btk¹⁹⁶. In Thrombozyten von XLA-Patienten, die nur eine Verminderung der Aggregation nach Stimulation mit niedrigen Kollagen-Konzentrationen zeigen¹³³, kam es zur Phosphorylierung von Tec nach Kollagen-Stimulation⁸⁹. Das zeigt, dass ein Fehlen oder eine Inaktivierung von Btk durch Tec kompensiert werden kann.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben erwähnten Studien an Thrombozyten von XLA-Patienten und Btk-defizienten Mausthrombozyten^{133, 196} wurde vor kurzem gezeigt, dass in menschlichen Thrombozyten, aktiviert durch geringe (halb-maximale) Kollagen-Konzentrationen, die Hemmung von Btk und nicht von Tec mit der Thrombozyten-hemmenden Potenz von Btk-Inhibitoren korreliert¹⁸⁷. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Ibrutinib die höchste Thrombozyten-hemmende Potenz unter den getesteten Btk-Inhibitoren aufweist, gefolgt von Acalabrutinib und ONO/GS-4059. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte eine neuerliche Studie, dass Ibrutinib, das auch in *in vitro kinase assays* die höchste Potenz bei der Btk-Hemmung aufweist, in niedrigeren Konzentrationen die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP hemmt als Acalabrutinib und andere Btk-Inhibitoren¹⁸⁷. Bemerkenswerterweise werden die Konzentrationen von Acalabrutinib (1-2 μM) und ONO/GS-4059 (2 μM), die die Plaque-induzierte statische Thrombozytenaggregation *in vitro* maximal hemmten, auch im Blut nach oraler Einnahme von therapeutischen Dosen erreicht (Acalabrutinib – 1,78 μM , ONO/GS-4059 – 1,95 μM)^{130, 169, 187, 197}. Bei Ibrutinib lag die für die komplette Hemmung der Plaque-induzierten

Thrombozytenaggregation notwendige Konzentration *in vitro* mit 0,5 μM etwas höher als die Plasmaspiegel bei Patienten unter Ibrutinib-Therapie (0,31 und 0,38 μM)¹⁸⁷.

Ibrutinib und die neuen Btk-Inhibitoren der zweiten Generation werden zur Therapie von hämato-onkologischen Erkrankungen (CLL, MCL, Morbus Waldenström) eingesetzt^{126, 127, 198}. Insbesondere für Ibrutinib liegen umfangreiche Langzeit-Sicherheitsdaten einer großen Anzahl von Patienten vor^{126, 199-201}. Folgende Nebenwirkungen sind mit Ibrutinib-Therapie assoziiert: Diarrhoe, Übelkeit, Fatigue, Arthralgien, Myalgien sowie Vorhofflimmern¹⁹⁹. Zudem wurden Blutungsereignisse unter Ibrutinib-Therapie beschrieben¹⁹⁹⁻²⁰¹. Laut einer großen Metaanalyse von 15 klinischen Studien inklusive 4 randomisierten klinischen Studien mit CLL- und MCL-Patienten (n = 1768) unter voll ausdosierter Ibrutinib-Therapie handelte es sich in den meisten Fällen um leichte Blutungsereignisse, wie spontane Blutergüsse, Epistaxis oder Petechien, die bei ca. 35 % von Patienten aufgetreten sind^{193, 200}. Dabei erfolgte bei ca. 50 % der Patienten mit CLL oder MCL gleichzeitig eine antithrombozytäre Therapie bzw. eine Antikoagulation^{193, 200}. Als Risikofaktoren für leichte Blutungen unter Ibrutinib-Therapie wurden niedrige Thrombozytenzahlen im Rahmen der Grunderkrankung sowie eine gleichzeitige antithrombozytäre Therapie oder Antikoagulation festgestellt^{193, 200}. Schwere Blutungsepisoden traten unter Langzeittherapie mit Ibrutinib nicht häufiger als bei Kontrollpatienten auf^{200, 201}. Zudem wurde festgestellt, dass das Risiko für schwergradige Blutungen bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen bei gleichzeitig bestehender antithrombozytärer Therapie oder Antikoagulation durch Ibrutinib nicht gesteigert wird^{193, 200}.

Aus der Fachinformation von dem neueren Btk-Inhibitor Acalabrutinib (Calquence®), das zur Behandlung des MCL zugelassen ist, geht bei den behandelten Patienten (n = 612) ein ähnliches Nebenwirkungsprofil mit Vorhofflimmern (3 %), leichten Blutungen (Petechien, Hämatome) (ca. 50 %) sowie in seltenen Fällen schwergradigen Blutungen Grad 3 und höher (gastrointestinal, intrakraniell) (2 %) hervor²⁰². Eine neuerliche Langzeitstudie an MCL-Patienten unter Calquence-Therapie (n = 121) ergab leichte Blutungsereignisse Grad 1 und 2 bei 33 % der Patienten, und eine laufende klinische Studie mit CLL-Patienten unter Calquence-Therapie (n = 99) berichtete über Blutungen aller Grade sogar bei 64 % der Patienten, davon über schwere Blutungsepisoden in 3 % der Fälle²⁰³. Bei den Patienten unter Therapie mit ONO/GS-4059 (n = 28) wurde eine ähnliche Inzidenz von leichten Blutungen (Petechien, Purpura, Hämatome) beschrieben¹⁷⁰. Somit ist das Nebenwirkungsprofil der Therapie von CLL und MCL mit Ibrutinib und den neuen Btk-Inhibitoren auch in Bezug auf Blutungen ähnlich¹⁹³. Wie oben erwähnt, weisen die Patienten mit XLA keine Blutungsneigung auf^{141, 194}. Leichte Blutungen unter Therapie mit Btk-Inhibitoren sind möglicherweise zumindest zum Teil auf die gleichzeitige Hemmung von Tec in Thrombozyten durch

die für die Behandlung von CLL und MCL notwendigen hohen Dosierungen der Btk-Hemmer zurückzuführen¹⁹³.

Die kleine Pilot-Studie, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde, zeigte, dass deutlich niedrigere Dosen von Ibrutinib (140 mg/Tag bzw. 140 mg jeden 2.Tag) als die für die CLL-Therapie üblicherweise verwendeten Dosen die Plaque-induzierte statische Thrombozytenaggregation und die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss effektiv und selektiv, ohne Beeinträchtigung der Kollagen-stimulierten Plättchenthrombenbildung hemmen (Abb. 31, 32). Im Gegensatz dazu wurde die Plaque-induzierte statische Thrombozytenaggregation und die Plaque-induzierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss durch niedrig-dosierte ASS deutlich weniger gehemmt (Abb. 33). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass niedrig-dosierte Btk-Inhibitoren eine wirksame Plaque-selektive antithrombozytäre Therapie darstellen könnten. Btk-Inhibitoren binden kovalent und irreversibel an Btk. Bei fehlendem Zellkern ist die Möglichkeit einer *De-Novo*-Synthese der Enzyme und anderer Proteine in Thrombozyten deutlich eingeschränkt. Dies könnte – ähnlich wie die irreversible und damit auf Thrombozyten begrenzte COX-Hemmung durch ASS¹⁸⁶ – für eine plättchenselektive Btk-Inhibition zunutze gemacht werden. Durch intermittierende Gaben niedrig-dosierter Btk-Inhibitoren könnte Btk in den Thrombozyten, die den Pfortaderkreislauf passieren, während der Resorptionsphase permanent inaktiviert werden. Dadurch wird das GPVI-*signaling* unterbrochen und somit der Schlüsselmechanismus für die Plaque-stimulierte Plättchenthrombenbildung für die Lebenszeit der Thrombozyten unterdrückt. Andere Körperzellen würden bei vorhandenem Zellkern die Btk kontinuierlich nachbilden. So wurden bei den Probanden nach niedrig-dosierter Ibrutinib-Einnahme in der kleinen Pilot-Studie keine Auswirkungen auf die Leukozyten-Zahlen (Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten) sowie keine Verminderung der B-Lymphozyten-Zahlen beobachtet. Das heißt zusammengefasst, dass durch die niedrige Dosierung von Ibrutinib und eine höhere Btk-Selektivität von neuen Btk-Inhibitoren das Risiko für potenzielle Nebenwirkungen reduziert werden könnte. Ein großer Vorteil von Btk-Inhibitoren im Vergleich zu dem derzeit klinisch getesteten rekombinanten dimeren Fusionsprotein GPVI-Fc (Revacept®) ist die Möglichkeit der oralen Einnahme von Btk-Inhibitoren.

Als Limitation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass die Experimente in dieser Arbeit im Hirudin-antikoagulierten Blut, das heißt in Abwesenheit der durch Plaque-*tissue factor* (TF) induzierten Koagulation⁸, durchgeführt wurden.

7. Klinische Relevanz

In dieser Dissertation wurde eine selektive und sehr potente Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf humanem atherosklerotischen Plaquematerial durch Syk-Inhibitoren (Syk Inhibitor II und R406) und irreversible Btk-Inhibitoren (Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059) entdeckt. Die Kollagen-stimulierte Plättchenthrombenbildung unter Fluss sowie die ADP- und Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation, die für die primäre Hämostase wichtig sind, wurden von diesen Substanzen ausgespart, sodass mit einem günstigen Sicherheitsprofil in Bezug auf das Blutungsrisiko gerechnet werden kann. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten könnten als Grundlage für klinische Studien dienen, in denen das Potenzial dieser neuen antithrombozytären Substanzen weiter eruiert werden kann.

Die oralen irreversiblen Btk-Inhibitoren werden zur Behandlung von hämatoonkologischen Erkrankungen, wie CLL, MCL und Morbus Waldenström, klinisch eingesetzt^{126, 127, 130, 169, 170, 198}, wobei insbesondere für Ibrutinib umfangreiche Langzeit-Sicherheitsdaten einer großen Patientenzahl vorliegen^{126, 199}. Die in dieser Dissertation erlangten Ergebnisse zusammen mit der wachsenden klinischen Erfahrung über die Langzeit-Sicherheit von selektiven Btk-Inhibitoren stellen die Grundlage für weitere Studien dar, in denen niedrig-dosierte Btk-Inhibitoren als erste orale Plaque-selektive antithrombozytäre Therapie untersucht werden könnten. Da es sich hierbei um eine neue Indikation für den Einsatz der Btk-Inhibitoren handeln würde, wäre das alleinige Verabreichen der Btk-Inhibitoren an die Patienten aus Sicherheitsgründen zu riskant. Aus diesem Grund müsste das Potential der selektiven Btk-Inhibitoren zunächst in Kombination mit den derzeit verwendeten antithrombotischen Substanzen (Heparin oder Faktor-Xa-Hemmer, ASS und/oder P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten) beispielsweise bei Patienten mit stabiler oder instabiler KHK oder NSTEMI, die sich einer PCI unterziehen, untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass Btk-Inhibitoren die Thrombozytenaktivierung, ausgelöst durch die Plaque-Verletzung im Rahmen der PCI, blockieren und damit die Effektivität der antithrombozytären Therapie deutlich verbessern.

Auch Syk-Inhibitoren könnten als selektive antithrombozytäre Therapie zur Prävention und Behandlung von akuten atherothrombotischen Ereignissen weiter verfolgt werden. Zur Vermeidung von *off-target*-Effekten und zur Minimierung von möglichen Nebenwirkungen, bedingt durch die Wirkungen der derzeit vorhandenen reversiblen Syk-Inhibitoren in anderen Körperzellen, wäre jedoch zunächst die Entwicklung von selektiven irreversibel wirkenden Syk-Inhibitoren erforderlich.

8. Zusammenfassung

Zur Verbesserung der derzeit eingesetzten antithrombozytären Therapie mit ASS und P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten wären Substanzen, die die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung effizient und spezifisch blockieren würden, ohne die physiologische Thrombozytenfunktion bei der primären Hämostase zu beeinträchtigen, sehr wünschenswert.

Die Interaktion von Plaque-Kollagen mit Glykoprotein VI (GPVI) ist essentiell für die Plättchenthrombenbildung im Bereich eines rupturierten oder erodierten atherosklerotischen Plaques (Atherothrombose). GPVI vermittelt die Thrombozytenaktivierung über die Aktivierung von Src-Familien-Kinasen sowie Syk und Btk. Eine gezielte Blockade dieser im GPVI-*signaling* beteiligten Tyrosinkinasen könnte eine neue vielversprechende Plaque-spezifische antithrombozytäre Therapie darstellen.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurden der Src-Familien-Kinasen-Inhibitor PD173952 und die Syk-Inhibitoren Syk Inhibitor II und R406 untersucht. PD173952, Syk Inhibitor II und R406 reduzierten die Plaque- und Kollagen-induzierte GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung unter statischen Bedingungen *in vitro*, wobei die durch TRAP stimulierte PAR-1 vermittelte Thrombozytenaggregation und ATP-Sekretion, die für die physiologische Hämostase wichtig sind, insbesondere durch Syk Inhibitor II und R406 auch bei hohen Inhibitor-Konzentrationen deutlich weniger gehemmt wurden. Unter arteriellen Flussbedingungen offenbarten sich deutliche Unterschiede zwischen Src-Familien-Kinasen- und Syk-Inhibitoren. Im Gegensatz zu PD173952, hemmte Syk Inhibitor II in niedriger Konzentration vollständig die Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat und Plaqueschnitten, wobei die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung nicht beeinflusst wurde. Auch R406 zeigte eine Plaque-selektive Hemmung der Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss. Somit ermöglichen Syk-Inhibitoren eine effektive Plaque-selektive Hemmung der Plättchenthrombenbildung mit Aussparung der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen unter Fluss und Thrombin, die für die primäre Hämostase wichtig ist.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden der irreversible Btk-Inhibitor Ibrutinib sowie die irreversiblen Btk-Inhibitoren der zweiten Generation Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 untersucht. Diese sind als orale Therapeutika zur Behandlung von hämatoonkologischen B-Zellerkrankungen zugelassen (Ibrutinib, Acalabrutinib) bzw. werden in klinischen Studien (ONO/GS-4059) untersucht. Btk spielt eine wichtige Rolle nicht nur im distalen GPVI-, sondern auch im GPIIb-*signaling*. Es wurde festgestellt, dass Ibrutinib, Acalabrutinib und ONO/GS-4059 die GPVI-abhängige statische durch atherosklerotisches Plaquehomogenat und Kollagen induzierte, jedoch nicht durch ADP und Arachidonsäure stimulierte Thrombozytenaggregation im Blut vollständig hemmen. Zudem wurde demonstriert, dass alle 3 getesteten

Btk-Inhibitoren die GPVI-vermittelte Plättchenthrombenbildung induziert durch atherosklerotisches Plaquematerial unter arteriellen Flussbedingungen effektiv hemmen und die $\alpha_2\beta_1$ - und vWF/GPIIb-vermittelte Thrombozytenadhäsion und Aggregation an fibrilläres Kollagen intakt lassen, was für die physiologische Hämostase wichtig ist. Die Plaque-selektive Hemmung der Thrombozytenaktivierung wurde auch *ex vivo* bei Patienten mit CLL unter Ibrutinib-Therapie (420 mg/Tag) sowie bei Probanden, die eine geringe Ibrutinib-Dosis (140 mg pro Tag bzw. jeden 2. Tag) eingenommen hatten, beobachtet. Somit können Btk-Inhibitoren durch die irreversible Blockade der Btk in der GPVI- und GPIIb-Signalkaskade die Plättchenthrombenbildung auf atherosklerotischem Plaque selektiv hemmen, ohne die Thrombozytenfunktion in der primären Hämostase zu beeinträchtigen. Aufgrund der irreversiblen Wirkung von Btk-Inhibitoren könnten die Thrombozyten, die den Pfortaderkreislauf passieren – ähnlich wie durch ASS – durch niedrig-dosierte Btk-Inhibitoren während der Resorptionsphase selektiv für ihre gesamte Lebensdauer (10 Tage) gehemmt werden, weil sie nicht wie andere Körperzellen mit vorhandenem Zellkern Btk kontinuierlich nachbilden. Im Vergleich zu Ibrutinib führte niedrig-dosierte ASS zu einer wesentlich geringeren Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaktivierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten als Grundlage für klinische Studien dienen, in denen das Potenzial niedrig-dosierter irreversibler Btk-Inhibitoren in Kombination mit etablierten antithrombotischen Substanzen beispielsweise bei Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris oder NSTEMI untersucht werden.

In der Zusammenschau der erlangten Ergebnisse könnten niedrig-dosierte irreversible Btk-Inhibitoren sich als erste oral wirksame Läsions-selektive antithrombozytäre Substanzen und neue, hocheffektive, spezifisch gegen die Atherothrombose gerichtete Thrombozytenaggregationshemmer erweisen. Auch Syk-Inhibitoren könnten als zukünftige antithrombozytäre Substanzen weiter verfolgt werden, falls irreversibel wirkende Syk-Inhibitoren zur Minimierung von möglichen Wirkungen auf andere Zellen entwickelt werden könnten.

9. Summary

Dual anti-platelet therapy with aspirin (acetylsalicylic acid) and a P2Y₁₂ antagonist reduces ischemic cardiovascular events at the cost of increased bleeding risk. An anti-atherothrombotic strategy that specifically targets plaque-stimulated platelet activation with high efficacy, but that leave physiologic hemostatic mechanisms intact, would be highly desirable.

Interaction of collagen with GPVI is essential for thrombus formation on ruptured or eroded atherosclerotic plaques (atherothrombosis). GPVI signals through Src family kinases, as well as through Syk and Btk. Targeting these tyrosine kinases involved in GPVI signaling may be a promising new plaque-specific antiplatelet therapy.

In the first part of this dissertation, the Src family kinase inhibitor PD173952 and the Syk inhibitors Syk inhibitor II and R406 were investigated. PD173952, Syk inhibitor II and R406 maximally suppressed plaque- and collagen-stimulated GPVI-mediated platelet activation and aggregation under static conditions *in vitro*. TRAP-induced platelet aggregation relevant in hemostasis was much less inhibited by Syk inhibitors than by PD173952 even at high inhibitor concentrations. In contrast to PD173952, Syk inhibitor II and R406 showed a preferential inhibition of platelet adhesion and thrombus formation onto plaque tissue sections and plaque homogenate under arterial flow as compared to collagen. Of note, Syk inhibitor II (2 μ M) fully dissociated the suppression of platelet thrombus formation onto plaque homogenate (-100%) and plaque tissue sections (-84%) from platelet aggregation onto collagen (-8%). In conclusion, low concentrations of Syk inhibitor II spare hemostatic platelet response to thrombin and collagen but suppress platelet thrombus formation on atherosclerotic plaque from arterially flowing blood.

In the second part of this dissertation, the irreversible Btk inhibitor ibrutinib, an established oral therapy for chronic lymphocytic leukemia (CLL), mantle cell lymphoma (MCL) and Waldenström macroglobulinemia with long-term safety, and the novel, in *kinase assays* more selective Btk inhibitors acalabrutinib (ACP-196) and ONO/GS-4059 were investigated. Btk has been reported to be involved in collagen/GPVI- and vWF/GPIb-triggered platelet signal transduction. It was found that ibrutinib and the novel second-generation Btk inhibitors acalabrutinib and ONO/GS-4059 suppress GPVI-mediated static platelet aggregation in blood exposed to human plaque homogenate and collagen but spare hemostatic platelet response to ADP or arachidonic acid. Furthermore, Btk inhibitors blocked platelet thrombus formation on human atherosclerotic plaque homogenate and plaque tissue sections from arterially flowing blood, whereas vWF- and integrin $\alpha_2\beta_1$ -dependent platelet response to collagen, which is necessary for physiologic hemostasis, was spared. This plaque-specific platelet inhibition was also detected in CLL

patients taking 420 mg of ibrutinib per day and in healthy volunteers taking much lower and intermittent dosing of ibrutinib (140 mg per day or 140 mg each 2nd day). It can be concluded that targeting GPVI and GPIb signal transduction by Btk inhibitors prevent platelet thrombus formation from flowing blood on ruptured or eroded atherosclerotic plaque but spare hemostatic platelet function.

In summary, low dosed irreversible Btk inhibitors may represent new, highly effective and selective antiplatelet agents against atherothrombosis and hold promise as the first culprit lesion-focused oral antiplatelet drugs. The Syk inhibitors could also be considered as future antiplatelet agents, if irreversible Syk inhibitors are developed to minimize *in vivo* effects on cells other than platelets.

10. Literaturverzeichnis

1. Gawaz MP. Das Blutplättchen. Stuttgart ; New York: Thieme; 1999.
2. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. JEM. 2002;196:887-96.
3. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nat. Med. 2002;8:1227-34.
4. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, et al. Platelets at work in primary hemostasis. Blood Rev. 2011;25:155-67.
5. Ruggeri ZM and Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. Circ Res. 2007;100:1673-85.
6. Nieswandt B and Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood. 2003;102:449-61.
7. Clemetson KJ and Clemetson JM. Platelet collagen receptors. Thromb Haemost. 2001;86:189-97.
8. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. FASEB J. 2005;19:898-909.
9. Moroi M and Jung SM. Integrin-mediated platelet adhesion. Front Biosci. 1998;3:d719-28.
10. Dutting S, Bender M and Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! Trends Pharmacol Sci. 2012;33:583-90.
11. Kuijpers MJ, Schulte V, Bergmeier W, et al. Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. FASEB J. 2003;17:685-7.
12. Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. J Biol Chem. 2000;381:389-96.
13. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. Physiol Rev. 1989;69:58-178.
14. Badimon L and Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. J. Intern. Med. 2014;276:618-32.
15. Smyth EM. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. J. Clin. Lipidol. 2010;5:209-219.
16. Simon MI, Strathmann MP and Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. Science (New York, NY). 1991;252:802-8.
17. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. Circ Res. 2006;99:1293-304.

18. Bauer M, Retzer M, Wilde JJ, et al. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood*. 1999;94:1665-72.
19. Woodside DG, Liu S and Ginsberg MH. Integrin activation. *Thromb Haemost*. 2001;86:316-23.
20. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103:4a-10a.
21. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ et al. GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1752-62.
22. The top 10 causes of death 2014. Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
23. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
24. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
25. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
26. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-20.
27. Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart*. 2003;89:1262-7.
28. Boren J, Olin K, Lee I, et al. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest*. 1998;101:2658-64.
29. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, et al. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:937-54.
30. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1262-75.
31. Gawaz M, Langer H and May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378-84.
32. Muller KA, Chatterjee M, Rath D et al. Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD. *Thromb Haemost*. 2015;114:498-518.
33. Ed Rainger G, Chimen M, Harrison MJ, et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*. 2015;26:507-20.
34. Shi G and Morrell CN. Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thromb Res*. 2011;127:387-90.
35. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;99:1726-32.

36. Thim T, Hagensen MK, Bentzon JF, et al. From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J. Intern. Med.* 2008;263:506-16.
37. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316:1371-5.
38. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, et al. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:297-303.
39. Spagnoli LG, Mauriello A, Sangiorgi G, et al. Extracranial thrombotically active carotid plaque as a risk factor for ischemic stroke. *JAMA.* 2004;292:1845-52.
40. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM and Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36-44.
41. van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, et al. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest.* 1994;93:615-32.
42. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1147-58.
43. Hechler B and Gachet C. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost.* 2011;105 Suppl 1:S3-12.
44. Siess W, Zangl KJ, Essler M, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96:6931-6.
45. Rother E, Brandl R, Baker DL, et al. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2003;108:741-7.
46. Farb A, Burke AP, Tang AL, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation.* 1996;93:1354-63.
47. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* 1999;99:348-53.
48. Penz SM, Reininger AJ, Toth O, et al. Glycoprotein Ibalph inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2007;97:435-43.
49. Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, et al. Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J.* 2005;19:825-7.
50. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol.* 2008;103:356-67.

51. Kuijpers MJ, Gilio K, Reitsma S, et al. Complementary roles of platelets and coagulation in thrombus formation on plaques acutely ruptured by targeted ultrasound treatment: a novel intravital model. *J Thromb Haemost.* 2009;7:152-61.
52. Ferreira JL and Angiolillo DJ. New directions in antiplatelet therapy. *Circ Cardiovasc Interv* 2012;5:433-45.
53. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, et al. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2005;353:2373-83.
54. Eikelboom JW and Hankey GJ. Failure of aspirin to prevent atherothrombosis: potential mechanisms and implications for clinical practice. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004;4:57-67.
55. Millard MA and Hernandez-Vila EA. What Do the Guidelines Really Say About Aspirin? *TEX HEART I J.* 2018;45:228-230.
56. Guirguis-Blake JM, Evans CV, Senger CA, et al. Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Events: A Systematic Evidence Review for the U.S. *Ann Intern Med* 2016;164:804-13.
57. Whitlock EP, Burda BU, Williams SB, et al. Bleeding Risks With Aspirin Use for Primary Prevention in Adults: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2016;164:826-35.
58. Gaziano JM, Brotons C, Coppolecchia R, et al. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2018;392:1036-1046.
59. McNeil JJ, Wolfe R, Woods RL, et al. Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. *N Engl J Med.* 2018;379:1509-1518.
60. Cattaneo M. New P2Y₁₂ inhibitors. *Circulation.* 2010;121:171-9.
61. Udell JA, Bonaca MP, Collet JP, et al. Long-term dual antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular events in the subgroup of patients with previous myocardial infarction: a collaborative meta-analysis of randomized trials. *Eur Heart J.* 2016;37:390-9.
62. Bonaca MP, Braunwald E and Sabatine MS. Long-Term Use of Ticagrelor in Patients with Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2015;373:1274-5.
63. Mauri L, Kereiakes DJ, Yeh RW, et al. Twelve or 30 months of dual antiplatelet therapy after drug-eluting stents. *N Engl J Med.* 2014;371:2155-66.
64. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357:2001-15.
65. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045-57.
66. Johnston SC and Amarenco P. Ticagrelor versus Aspirin in Acute Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med.* 2016;375:1395.

67. Wu CM, McLaughlin K, Lorenzetti DL, et al. Early risk of stroke after transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167:2417-22.
68. Coull AJ, Lovett JK and Rothwell PM. Population based study of early risk of stroke after transient ischaemic attack or minor stroke: implications for public education and organisation of services. *BMJ.* 2004;328:326.
69. Baigent C, Blackwell L, Collins R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373:1849-60.
70. De Luca G, Navarese E and Marino P. Risk profile and benefits from Gp IIb-IIIa inhibitors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty: a meta-regression analysis of randomized trials. *Eur Heart J.* 2009;30:2705-13.
71. Adams HP, Jr., Effron MB, Torner J, et al. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke.* 2008;39:87-99.
72. Ciccone A, Motto C, Abraha I, et al. Glycoprotein IIb-IIIa inhibitors for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014:Cd005208.
73. Tricoci P, Huang Z, Held C, et al. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2012;366:20-33.
74. Scirica BM, Bonaca MP, Braunwald E, et al. Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2 degrees P-TIMI 50 trial. *Lancet.* 2012;380:1317-24.
75. Levine GN. Balancing Ischemic and Bleeding Risks of Prolonged Dual Antiplatelet Therapy. *JAMA.* 2017;318:194-195.
76. Secemsky EA, Yeh RW, Kereiakes DJ, et al. Mortality Following Cardiovascular and Bleeding Events Occurring Beyond 1 Year After Coronary Stenting: A Secondary Analysis of the Dual Antiplatelet Therapy (DAPT) Study. *JAMA Cardiol.* 2017;2:478-487.
77. Watson SP, Herbert JM and Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1456-67.
78. Moroi M and Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 2004;114:221-33.
79. Herr AB and Farndale RW. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen. *J Biol Chem.* 2009;284:19781-5.
80. Jung SM, Moroi M, Soejima K, et al. Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood. *J Biol Chem.* 2012;287:30000-13.

81. Stegner D, Haining EJ and Nieswandt B. Targeting glycoprotein VI and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1615-20.
82. Berlanga O, Bori-Sanz T, James JR, et al. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1026-1033.
83. Horii K, Kahn ML and Herr AB. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood.* 2006;108:936-42.
84. Feng J, Garrity D, Call ME, et al. Convergence on a distinctive assembly mechanism by unrelated families of activating immune receptors. *Immunity.* 2005;22:427-38.
85. Jung SM, Tsuji K and Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1347-55.
86. Arthur JF, Shen Y, Kahn ML, et al. Ligand binding rapidly induces disulfide-dependent dimerization of glycoprotein VI on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282:30434-41.
87. Schmaier AA, Zou Z, Kazlauskas A, et al. Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor to adopt a hemostatic role. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:21167-72.
88. Liu J, Fitzgerald ME, Berndt MC, et al. Bruton tyrosine kinase is essential for botrocetin/VWF-induced signaling and GPIIb-dependent thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;108:2596-603.
89. Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, et al. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood.* 2000;95:1663-70.
90. Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev.* 2009;228:58-73.
91. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP and Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 1985;318:470-2.
92. Nuytens BP, Thijs T, Deckmyn H and Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res.* 2011;127 Suppl 2:S26-9.
93. Siljander PR, Hamaia S, Peachey AR, et al. Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 2004;279:47763-72.
94. Jung SM and Moroi M. Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions. *J Biol Chem.* 1998;273:14827-37.
95. Savage B, Ginsberg MH and Ruggeri ZM. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood.* 1999;94:2704-15.
96. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, et al. Identification in collagen type I of an integrin alpha2 beta1-binding site containing an essential GER sequence. *J Biol Chem.* 1998;273:33287-94.

97. Knight CG, Morton LF, Peachey AR, et al. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem.* 2000;275:35-40.
98. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, et al. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol.* 2003;160:769-80.
99. Consonni A, Cipolla L, Guidetti G, et al. Role and regulation of phosphatidylinositol 3-kinase beta in platelet integrin alpha2beta1 signaling. *Blood.* 2012;119:847-56.
100. Severin S, Nash CA, Mori J, et al. Distinct and overlapping functional roles of Src family kinases in mouse platelets. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1631-45.
101. Senis YA, Mazharian A and Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood.* 2014;124:2013-24.
102. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, et al. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood.* 2000;96:4246-53.
103. Xiang B, Zhang G, Stefanini L, et al. The Src family kinases and protein kinase C synergize to mediate Gq-dependent platelet activation. *J Biol Chem.* 2012;287:41277-87.
104. Marshall SJ, Senis YA, Auger JM, et al. GPIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood.* 2004;103:2601-9.
105. Mocsai A, Ruland J and Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:387-402.
106. Deng GM, Kyttaris VC and Tsokos GC. Targeting Syk in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol.* 2016;7:78.
107. Geahlen RL. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35:414-22.
108. Lucas MC and Tan SL. Small-molecule inhibitors of spleen tyrosine kinase as therapeutic agents for immune disorders: will promise meet expectations? *Future Med. Chem.* 2014;6:1811-27.
109. Suzuki-Inoue K, Wilde JI, Andrews RK, et al. Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase Cgamma2 at distinct sites. *Biochem J.* 2004;378:1023-9.
110. Sheridan C. Small molecule challenges dominance of TNF-alpha inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 2008;26:143-4.
111. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, et al. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:998-1008.

112. Pine PR, Chang B, Schoettler N, et al. Inflammation and bone erosion are suppressed in models of rheumatoid arthritis following treatment with a novel Syk inhibitor. *Clin Immunol.* 2007;124:244-57.
113. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, et al. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2010;363:1303-12.
114. Deng GM, Liu L, Bahjat FR, et al. Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2086-92.
115. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2010;115:2578-85.
116. Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, et al. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood.* 2009;113:3154-60.
117. Spalton JC, Mori J, Pollitt AY, et al. The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1192-9.
118. Andre P, Morooka T, Sim D, et al. Critical role for Syk in responses to vascular injury. *Blood.* 2011;118:5000-10.
119. van Eeuwijk JM, Stegner D, Lamb DJ, et al. The Novel Oral Syk Inhibitor, BI1002494, Protects Mice From Arterial Thrombosis and Thromboinflammatory Brain Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:1247-53.
120. Delaney S, Sinha U, Nanda N, et al. Specific Pharmacological Targeting of the Syk Kinase Activity in Platelets: A Novel, Safe Anti-Thrombotic Strategy. *Blood.* 2008;112:409--409.
121. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K, et al. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in α IIb β 3 signaling in platelets. *Blood.* 1999;93:2645-52.
122. Scott IC and Scott DL. Spleen tyrosine kinase inhibitors for rheumatoid arthritis: where are we now? *Drugs.* 2014;74:415-22.
123. Speich HE, Grgurevich S, Kueter TJ, et al. Platelets undergo phosphorylation of Syk at Y525/526 and Y352 in response to pathophysiological shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295:C1045-54.
124. Hisamichi H, Naito R, Toyoshima A, et al. Synthetic studies on novel Syk inhibitors. Part 1: Synthesis and structure-activity relationships of pyrimidine-5-carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2005;13:4936-51.
125. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107:13075-80.
126. Wang ML, Blum KA, Martin P, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood.* 2015;126:739-45.

127. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369:32-42.
128. Yosef A, Touloukian EZ and Nambudiri VE. Ibrutinib in the management of Waldenstrom macroglobulinemia. *J Oncol Pharm Pract*. 2018;1078155218786037.
129. Imbruvica. Highlights of prescribing information. 2018.
130. Walter HS, Rule SA, Dyer MJ, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood*. 2016;127:411-9.
131. Wu J, Liu C, Tsui ST and Liu D. Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *J Hematol Oncol*. 2016;9:80.
132. Whang JA and Chang BY. Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov. Today*. 2014;19:1200-4.
133. Quek LS, Bolen J and Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol*. 1998;8:1137-40.
134. Laffargue M, Ragab-Thomas JM, Ragab A, et al. Phosphoinositide 3-kinase and integrin signalling are involved in activation of Bruton tyrosine kinase in thrombin-stimulated platelets. *FEBS Lett*. 1999;443:66-70.
135. Bye AP, Unsworth AJ, Vaiyapuri S, et al. Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin α IIb β 3 Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2326-35.
136. Levade M, David E, Garcia C, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014;124:3991-5.
137. Kamel S, Horton L, Ysebaert L, et al. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia*. 2015;29:783-7.
138. Kazianka L, Drucker C, Skrabs C, et al. Ristocetin-induced platelet aggregation for monitoring of bleeding tendency in CLL treated with ibrutinib. *Leukemia*. 2017;31:1117-1122.
139. Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, et al. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost*. 2017;15:835-847.
140. Rigg RA, Aslan JE, Healy LD, et al. Oral administration of Bruton's tyrosine kinase inhibitors impairs GPVI-mediated platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016;310:C373-80.
141. Stewart DM, Lian L and Nelson DL. The clinical spectrum of Bruton's agammaglobulinemia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1:558-65.
142. Jamasbi J, Ayabe K, Goto S, et al. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. *Thromb Haemost*. 2017;117:1249-1257.

143. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197:41-9.
144. Li H, Lockyer S, Concepcion A, et al. The Fab fragment of a novel anti-GPVI monoclonal antibody, OM4, reduces in vivo thrombosis without bleeding risk in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1199-205.
145. Arthur JF, Dunkley S and Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol*. 2007;139:363-72.
146. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med*. 2001;193:459-69.
147. ClinicalTrials.gov, NCT01645306. Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02). Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306?cond=Revacept&rank=1> Stand 26.08.2018.
148. ClinicalTrials.gov, NCT03312855. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Lesion Platelet Adhesion as Selective Target of Endovenous Revacept (ISAR-PLASTER). Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03312855?cond=Revacept&rank=2> Stand 26.08.2018.
149. Ungerer M, Rosport K, Bultmann A, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123:1891-9.
150. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, et al. Cross-Linking GPVI-Fc by Anti-Fc Antibodies Potentiates Its Inhibition of Atherosclerotic Plaque- and Collagen-Induced Platelet Activation. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:131-142.
151. Firbas C, Siller-Matula JM and Jilma B. Targeting von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib receptor. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8:1689-701.
152. ClinicalTrials.gov, NCT02878603. Follow-up Study for Patients Who Completed Study ALX0681-C301 (Post-HERCULES). Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02878603?cond=ALX-0081&rank=2> Stand 01.09.2018.
153. Jilma-Stohlawetz P, Gorczyca ME, Jilma B, et al. Inhibition of von Willebrand factor by ARC1779 in patients with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 2011;105:545-52.
154. Jilma B, Paulinska P, Jilma-Stohlawetz P, et al. A randomised pilot trial of the anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 in patients with type 2b von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2010;104:563-70.
155. ClinicalTrials.gov, NCT00726544. Clinical Outcome Study of ARC1779 Injection in Patients With Thrombotic Microangiopathy. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00726544?cond=ARC1779&rank=4> Stand 01.09.2018.

156. ClinicalTrials.gov, NCT00694785. A Study of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of ARC1779 Injection in Patients With Von Willebrand Disease Type 2B.
Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00694785?cond=ARC1779&rank=5>
Stand 01.09.2018.
157. Bartunek J, Barbato E, Heyndrickx G, et al. Novel antiplatelet agents: ALX-0081, a Nanobody directed towards von Willebrand factor. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6:355-63.
158. Xu XR, Carrim N, Neves MA, et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thromb J*. 2016;14:29.
159. Jamasbi J, Megens RT, Bianchini M, et al. Differential Inhibition of Human Atherosclerotic Plaque-Induced Platelet Activation by Dimeric GPVI-Fc and Anti-GPVI Antibodies: Functional and Imaging Studies. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2404-15.
160. Brandl R, Richter T, Haug K, et al. Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. *Circulation*. 1997;96:3360-8.
161. Dwivedi S, Pandey D, Khandoga AL, et al. Rac1-mediated signaling plays a central role in secretion-dependent platelet aggregation in human blood stimulated by atherosclerotic plaque. *J Transl Med*. 2010;8:128.
162. Toth O, Calatzis A, Penz S, et al. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost*. 2006;96:781-8.
163. Bampalis VG, Brantl SA and Siess W. Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1710-4.
164. Van Kruchten R, Cossemans JM and Heemskerk JW. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers - a practical guide. *Platelets*. 2012;23:229-42.
165. Kratzer MA, Negrescu EV, Hirai A, et al. The Thrombostat system. A useful method to test antiplatelet drugs and diets. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21 Suppl 2:25-31.
166. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21 Suppl 2:106-12.
167. Busygina K, Jamasbi J, Seiler T, et al. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation. *Blood*. 2018; 131:2605-2616.
168. Wu Y, Span LM, Nygren P, et al. The Tyrosine Kinase c-Src Specifically Binds to the Active Integrin α IIb β 3 to Initiate Outside-in Signaling in Platelets. *J Chem Biol*. 2015;290:15825-34.
169. Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, et al. Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:323-32.
170. Walter HS, Jayne S, Rule SA, et al. Long-term follow-up of patients with CLL treated with the selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor ONO/GS-4059. *Blood*. 2017;129:2808-2810.

171. Reneman RS, Arts T and Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res.* 2006;43:251-69.
172. Liu B and Tang D. Influence of non-Newtonian properties of blood on the wall shear stress in human atherosclerotic right coronary arteries. *Mol Cell Biomech.* 2011;8:73-90.
173. Samady H, Eshtehardi P, McDaniel MC, et al. Coronary artery wall shear stress is associated with progression and transformation of atherosclerotic plaque and arterial remodeling in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2011;124:779-88.
174. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M and Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:444-50.
175. Penz SM, Bernlochner I, Toth O, et al. Selective and rapid monitoring of dual platelet inhibition by aspirin and P2Y₁₂ antagonists by using multiple electrode aggregometry. *Thromb J.* 2010;8:9.
176. Cheruvu PK, Finn AV, Gardner C, et al. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: a pathologic study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:940-9.
177. Furie B and Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med.* 2008;359:938-49.
178. He L, Pappan LK, Grenache DG, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood.* 2003;102:3652-7.
179. Munnix IC, Strehl A, Kuijpers MJ, et al. The glycoprotein VI-phospholipase Cgamma2 signaling pathway controls thrombus formation induced by collagen and tissue factor in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2673-8.
180. Nonne C, Lenain N, Hechler B, et al. Importance of platelet phospholipase Cgamma2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1293-8.
181. Marjoram RJ, Li Z, He L, et al. alpha2beta1 integrin, GPVI receptor, and common FcRgamma chain on mouse platelets mediate distinct responses to collagen in models of thrombosis. *PloS one.* 2014;9:e114035.
182. Weinblatt ME, Genovese MC, Ho M, et al. Effects of fostamatinib, an oral spleen tyrosine kinase inhibitor, in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: results from a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:3255-64.
183. Coffey G, DeGuzman F, Inagaki M, et al. Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340:350-9.
184. Reilly MP, Sinha U, Andre P, et al. PRT-060318, a novel Syk inhibitor, prevents heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis in a transgenic mouse model. *Blood.* 2011;117:2241-6.

185. Baluom M, Grossbard EB, Mant T and Lau DT. Pharmacokinetics of fostamatinib, a spleen tyrosine kinase (SYK) inhibitor, in healthy human subjects following single and multiple oral dosing in three phase I studies. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76:78-88.
186. Lorenz RL, Boehlig B, Uedelhoven WM and Weber PC. Superior antiplatelet action of alternate day pulsed dosing versus split dose administration of aspirin. *Am J Cardiol*. 1989;64:1185-8.
187. Chen J, Kinoshita T, Gururaja T, et al. The effect of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors on collagen-induced platelet aggregation, BTK, and tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma (TEC). *Eur J Haematol*. 2018.
188. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31:88-94.
189. Denzinger V, Busygina K, Jamasbi J, et al. Optimizing Platelet GPVI Inhibition versus Haemostatic Impairment by the Btk Inhibitors Ibrutinib, Acalabrutinib, ONO/GS-4059, BGB-3111 and Evobrutinib. *Thromb Haemost*. 2019;119:397-406.
190. Deckmyn H, De Meyer SF, Broos K and Vanhoorelbeke K. Inhibitors of the interactions between collagen and its receptors on platelets. *Handb Exp Pharmacol* 2012:311-37.
191. Bye AP, Unsworth AJ, Desborough MJ, et al. Severe platelet dysfunction in NHL patients receiving ibrutinib is absent in patients receiving acalabrutinib. *Blood Adv*. 2017;1:2610-2623.
192. Kraft WK, Gilmartin JH, Chappell DL, et al. Effect of Vorapaxar Alone and in Combination with Aspirin on Bleeding Time and Platelet Aggregation in Healthy Adult Subjects. *Clin Transl Sci*. 2016;9:221-7.
193. Busygina K, Denzinger V, Bernlochner I, Weber C, Lorenz R and Siess W. Btk Inhibitors as First Oral Atherothrombosis-Selective Antiplatelet Drugs? *Thromb Haemost*. 2019.
194. Futatani T, Watanabe C, Baba Y, et al. Bruton's tyrosine kinase is present in normal platelets and its absence identifies patients with X-linked agammaglobulinaemia and carrier females. *Br J Haematol*. 2001;114:141-9.
195. Nicolson PLR, Hughes CE, Watson S, et al. Inhibition of Btk by Btk-specific concentrations of ibrutinib and acalabrutinib delays but does not block platelet aggregation to GPVI. *Haematologica*. 2018.
196. Atkinson BT, Ellmeier W and Watson SP. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood*. 2003;102:3592-9.
197. Barf T, Covey T, Izumi R, et al. Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;363:240-252.
198. Mazzucchelli M, Frustaci AM, Deodato M, et al. Waldenstrom's Macroglobulinemia: An Update. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10:e2018004.
199. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015;125:2497-506.

200. Brown JR, Moslehi J, Ewer MS, et al. Incidence of and risk factors for major haemorrhage in patients treated with ibrutinib: An integrated analysis. *Br J Haematol.* 2019;184:558-569.
201. Caron F, Leong DP, Hillis C, et al. Current understanding of bleeding with ibrutinib use: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* 2017;1:772-778.
202. Calquence. Full prescribing information 2017.
Verfügbar unter: www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/210259s000lbl.pdf.
203. AstraZeneca. New long-term data on Calquence presented at ASH 2018.
Verfügbar unter: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2018/new-long-term-data-on-calquence-presented-at-ash-2018-03122018.html>.

11. Appendix

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des thrombozytären GPVI-Dimers und der nachgeschalteten Signalkaskade	18
Abbildung 2:	Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaque, Kollagen, TRAP, ADP und Arachidonsäure (AA)	46
Abbildung 3:	Wirkung des Src-Familien-Kinasen-Inhibitors PD173952 auf die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte ATP-Sekretion im Blut	48
Abbildung 4:	DMSO zeigt keinen Einfluss auf Plaque- und Kollagen-induzierte Thrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	49
Abbildung 5A:	Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung durch PD173952 unter arteriellen Flussbedingungen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen.	50
Abbildung 5B:	Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung durch PD173952 unter arteriellen Flussbedingungen. Kinetik.	51
Abbildung 6:	Dosis-Wirkungs-Kurven von PD173952 für die Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf Plaquematerial und Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen	52
Abbildung 7:	Wirkung des Syk Inhibitor II auf die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Plaque, Kollagen, TRAP, ADP, Arachidonsäure (AA) und U46619 (TxA ₂ -Rezeptor-Agonist)	53
Abbildung 8:	Wirkung des Syk Inhibitor II auf die Plaque-, Kollagen- und TRAP-induzierte ATP-Sekretion im Blut	55
Abbildung 9:	Selektive Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung durch Syk Inhibitor II unter arteriellen Flussbedingungen ...	56
Abbildung 10:	Wirkung des Syk Inhibitor II (5 µM und 10 µM) auf die Kinetik der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s)	58

Appendix

Abbildung 11:	Dosis-Wirkungs-Kurven von Syk Inhibitor II für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	59
Abbildung 12:	Wirkung des Syk Inhibitor R406 auf die Plaque-, Kollagen-, TRAP- und ADP-induzierte Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen	60
Abbildung 13:	Selektive Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung durch Syk Inhibitor R406 unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s)	61
Abbildung 14:	Wirkung von Ibrutinib auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Plaquehomogenat, Kollagen, TRAP, ADP und AA	62
Abbildung 15:	MEA-Kurven der Plaque-, Kollagen- und TRAP-stimulierten Thrombozytenaggregation im Blut. Wirkung von Ibrutinib.	63
Abbildung 16:	Wirkung von Ibrutinib auf die statische Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Ristocetin	64
Abbildung 17:	Wirkung von Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit dem PAR-4-Rezeptor-Agonisten AY-NH2	65
Abbildung 18:	Wirkung von Acalabrutinib und ONO/GS-4059 auf die statische Thrombozytenaggregation im Blut nach Stimulation mit Plaquehomogenat, Kollagen, TRAP, ADP und AA	66
Abbildung 19:	MEA-Kurven der Plaque-, Kollagen- und TRAP-stimulierten Thrombozytenaggregation im Blut. Wirkungen von Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059	67
Abbildung 20:	ADP-Stimulation hebt hemmende Wirkung der Btk-Inhibitoren auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation auf	68
Abbildung 21:	Ibrutinib hemmt die Plaque-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung bei niedriger arterieller Flussgeschwindigkeit (Wandscherrate von 600/s)	69
Abbildung 22:	Ibrutinib hemmt die Plaque-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung bei hoher arterieller Flussgeschwindigkeit (Wandscherrate von 1500/s)	70

Abbildung 23:	Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 hemmen die Plaque-, jedoch nicht die Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen	72
Abbildung 24:	Dosis-Wirkungs-Kurven von (A) Ibrutinib, (B) Acalabrutinib und (C) ONO/GS-4059 für die Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s)	73
Abbildung 25:	Wirkung von Ibrutinib, Acalabrutinib (ACP-196) und ONO/GS-4059 auf die Plaque-induzierte thrombozytäre ATP-Sekretion im Blut	74
Abbildung 26:	Mechanismus der Plaque-selektiven Hemmung der Thrombenbildung durch Ibrutinib unter Fluss: der Anti- $\alpha_2\beta_1$ -Antikörper 6F1, jedoch nicht Ibrutinib, hemmt die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes lösliches Kollagen unter arteriellen Flussbedingungen	75
Abbildung 27:	Der Anti-GPIIb-Antikörper 6B4 hemmt die Plaque- und Kollagen-induzierte Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei hoher Scherrate	76
Abbildung 28:	Hemmung der Plaque- und Kollagen-induzierten statischen Thrombozytenaggregation im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie	77
Abbildung 29:	Hemmung der Plaque-, jedoch nicht der Kollagen-vermittelten Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen im Blut von Patienten unter Ibrutinib-Therapie	79
Abbildung 30:	Wirkung der Ibrutinib-Therapie auf die <i>in vitro</i> Blutungszeit	80
Abbildung 31:	Wirkung der oralen Einnahme einer Startdosis von Ibrutinib (420 mg) auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss (Proband B)	81
Abbildung 32:	Wirkung einer einwöchigen oralen Einnahme von Ibrutinib in niedriger Dosis auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und Plättchenthrombenbildung unter arteriellem Fluss bei zwei Probanden	82
Abbildung 33:	Wirkung einer einwöchigen oralen Einnahme von niedrig-dosierter ASS auf die Thrombozytenaggregation unter statischen Bedingungen und die Plättchenthrombenbildung unter arteriellen Flussbedingungen bei zwei Probanden	85

Appendix

Abbildung 34: Modell einer Plaque-selektiven Hemmung der Plättchenthrombenbildung durch Btk-Inhibitoren 94

Tabelle 1: Wirkung oraler Einnahme von Ibrutinib auf das Blutbild der Spender A und B 83

11.2 Videoverzeichnis

Auf der beigelegten CD befinden sich folgende Videos:

Video 1 **Thrombozytenadhäsion, Aggregation und Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat unter arteriellen Flussbedingungen (Scherrate 600/s).**

Die Blutproben wurden mit Mepacrine zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Anschließend wurde Plaquehomogenat für 3 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Plaquehomogenat und Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 2 **Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat wurde durch Syk Inhibitor II (2 µM) vollständig gehemmt.**

Die Blutproben wurden mit Mepacrine zur Thrombozytenmarkierung und Syk Inhibitor II (2 µM) vorinkubiert. Plaquehomogenat wurde für 3 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 3 **Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat im Blut eines Kontrollpatienten ohne Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Plaquehomogenat wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Plaquehomogenat und Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 4 **Vollständige Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf Plaquehomogenat im Blut eines CLL-Patienten unter Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Plaquehomogenat wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Plaquehomogenat und Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 5 **Plättchenthrombenbildung auf einem Plaqueschnitt im Blut eines Kontrollpatienten ohne Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Plaqueschnitt wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Plaqueschnitt und Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 6 **Hemmung der Plättchenthrombenbildung auf einem Plaqueschnitt im Blut eines CLL-Patienten unter Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Plaqueschnitt wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Plaqueschnitt und Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 7 **Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern im Blut eines Kontrollpatienten ohne Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Kollagen wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Video 8 **Plättchenthrombenbildung auf Kollagenfasern im Blut eines CLL-Patienten unter Ibrutinib-Therapie.**

Blutproben wurden mit DiOC6 zur Thrombozytenmarkierung vorinkubiert. Kollagen wurde für 5 min mit Blut perfundiert (Scherrate 600/s). Thrombozyten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (1 Bild/3 s) unter Verwendung eines 10x Objektivs (NA 0,4) dargestellt. Flussrichtung: von rechts nach links.

Die Videos 3-8 sind publiziert¹⁶⁷.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Christian Weber für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankheiten (IPEK) zu promovieren.

Dank gebührt auch dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) für die Förderung und finanzielle Unterstützung von meinem Projekt und somit für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Wolfgang Siess für die Vergabe dieses spannenden Themas und exzellente Betreuung meiner Dissertation. Seine kontinuierliche Unterstützung, die vielen Anregungen, wertvolle Verbesserungsvorschläge sowie konstruktive Kritik haben entscheidend zum Erfolg meiner Doktorarbeit beigetragen. Vielen Dank für die gute Kommunikation, die selbst während seiner Auslandsaufenthalte perfekt funktionierte.

Herrn Professor Dr. Reinhard Lorenz danke ich ganz herzlich für seine tatkräftige Unterstützung meines Projekts. Seine enorme wissenschaftliche Erfahrung, die wertvollen Verbesserungsvorschläge bei der Verfassung von Publikationen und Durchführung von Statistik-Rechnungen waren für meine Dissertation unabdingbar.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Richard Brandl für die Bereitstellung von atherosklerotischem Plaquematerial für meine Experimente.

Dank gebührt Kathrin von Oheimb für ihre technische Assistenz, die wertvollen Tipps und die unverzichtbare Unterstützung im Laboralltag.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Remco Megens für die Bearbeitung der Videos für meine Dissertation bedanken.

Ganz besonders danke ich den Kolleginnen meiner Arbeitsgruppe für die exzellente Zusammenarbeit und die wundervolle Arbeitsatmosphäre im Labor. Ein ganz spezieller Dank gebührt Dr. Janina Jamasbi. Liebe Nini, danke Dir, dass Du mich stets mit Rat und Tat unterstützt hast und mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen bist! Danke für Deine hervorragende Betreuung, von Dir habe ich sehr viel gelernt. Aus unserer hervorragenden Zusammenarbeit im Labor ist eine Freundschaft für das Leben entstanden. Das weiß ich sehr zu schätzen!

Danksagung

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden. Michael und Christel Ahlbrecht danke ich für das Zuhören und die moralische Unterstützung. Kathrin Frey bin sehr dankbar, dass wir immer wieder gemeinsam etwas unternommen haben – das war ein sehr schöner und wichtiger Ausgleich.

Meiner lieben Mama möchte ich herzlichst danken, dass sie mir das Studium in Deutschland ermöglicht und mich über die Jahre so liebevoll und großartig unterstützt hat. Liebe Mama, ohne Dich hätte ich das alles nicht geschafft!

Ein ganz spezieller Dank gebührt meiner inzwischen verstorbenen Oma. Ihr danke ich ganz herzlich für die großartige Unterstützung, das Zuhören und dafür, dass sie stets an mich geglaubt hatte. Das werde ich nie vergessen!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Michael Müller bedanken. Danke, dass Du mich so liebevoll unterstützt hast, für Deine motivierenden Worte, Deine unendliche Geduld und Verständnis. Du hast mir viel Kraft und Mut gegeben. Ich bin sehr glücklich, so jemand wie Dich an meiner Seite zu haben. Du bist der Beste!

